

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Ruchholtz

des Fachbereichs Medizin der Philipps- Universität Marburg in

Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

Untersuchung zum 3-D- Einwachsverhalten von Osteoblasten like cells (MG63) in resorbierbare Gelatine- Schwämme



Inaugural- Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps- Universität Marburg
vorgelegt von

Ralf Pinkernell

aus Münster

Marburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps – Universität Marburg

am: 10.11.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Rothmund

Referent: PD Dr. Stiletto

Korreferent: Prof. Dr. Jones

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig.

*Man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Mögliche
getan hat.*

Johann Wolfgang von Goethe, „Italienreise“ (1787)

Diese Arbeit ist meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

- 1.1 Geschichte der Knochentransplantation
- 1.2 Knochentransplantation aus heutiger Sicht
- 1.3 Knochenersatzmaterialien
 - 1.3.1 autologe Knochentransplantation
 - 1.3.2 allogene Knochentransplantation
 - 1.3.3 xenogene Knochentransplantation
 - 1.3.4 künstliche Knochenersatzmaterialien
- 1.4 Zytokine
 - 1.4.1 Tumornekrosefaktor – α (TNF – α)
 - 1.4.2 Interleukin – 8 (IL – 8)
 - 1.4.3 Interleukin – 6 (IL – 6)
- 1.5 MG63 (Osteoblasten like cells)
- 1.6 Mechanismus der Fortbewegung von kultivierten Zellen
- 1.7 Knochenzell- und Vitalitätsmarker
 - 1.7.1 Laktat
 - 1.7.2 Laktatdehydrogenase (LDH)
 - 1.7.3 Osteocalcin
 - 1.7.4 Calcium
- 1.8 Fragestellung und Zielsetzung

II. Material und Methode

- 2.1 Beschreibung des Testmaterials
 - 2.1.1 Spongostan

- 2.1.2 MG63
- 2.2 Versuchsaufbau
- 2.3 Zellkulturmedium
- 2.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen
- 2.5 Kultivieren der Zellen
- 2.6 Zellzahlbestimmung
- 2.7 Aufbereitung zur Histologie
 - 2.7.1 Paraffineinbettung
 - 2.7.2 Paraffinschnitte
 - 2.7.3 HE – Färbung
 - 2.7.4 Rasterelektronenmikroskopie
- 2.8 Messung der Zytokine
- 2.9 Bestimmung der Enzyme und Vitalitätsmarker
 - 2.9.1 Laktat – Bestimmung
 - 2.9.2 Messung der Laktatdehydrogenase
 - 2.9.3 Bestimmung von Osteocalcin
 - 2.9.4 Bestimmung von Calcium
- 2.10 MTT – Test
- 2.11 Liste der verwendeten Materialien und Geräte
- 2.12 Abkürzungsverzeichnis
- 2.13 Statistik

III. Ergebnisse

- 3.1 Zytokinausschüttung
 - 3.1.1 Tumornekrosefaktor – α (TNF – α)
 - 3.1.2 Interleukin – 8 (IL – 8)
 - 3.1.3 Interleukin – 6 (IL – 6)

- 3.2 Laktat
- 3.3 Laktatdehydrogenase, Osteocalcin, Calcium
- 3.4 Histologie und Einwachsverhalten
- 3.5 MTT – Test

IV. Diskussion

- 4.1 Spongostan als Trägersubstanz
- 4.2 Histologie und Einwachsverhalten
- 4.3 Knochen – und Vitalitätsmarker
 - 4.4.1 Laktatdehydrogenase
 - 4.4.2 Osteocalcin und Calcium
- 4.4 Zytokine

V. Zusammenfassung

VI. Literaturverzeichnis

VII. Anhang

Verzeichnis akademischer Lehrer

Danksagung

I. Einleitung

1.1 Geschichte der Knochentransplantation

Erste Berichte über Knochentransplantationen reichen bis in das 17. Jahrhundert zurück. Der Holländer Rob van Meekeren führte 1668 die erste xenogene Knochentransplantation durch, indem er einen Knochendefekt im Schädel eines verwundeten Soldaten mit einem Knochenstück aus der Schädelkalotte eines Hundes füllte [van Meekeren 1668].

Der Beginn der wissenschaftlichen Lehre der Knochentransplantation datiert aus dem Jahr 1858 und geht auf den Franzosen Ollier zurück. In seinem Buch „Traite experimental et clinique de la Regeneration des Os“ [Ollier 1867] verdeutlichte er die wichtige Funktion des Periost bei der Frakturheilung und unterteilte erstmals die verschiedenen Transplantationsarten wie in der Abbildung gezeigt.

Autogen/ autolog	Isogen/ isolog	Allogen/ Homolog	Xenogen/ heterolog	Knochenersatz- mittel
Transplantat entstammt vom selben Individuum	Transplantat entstammt vom genetisch identischen Individuum (eineiige Zwillinge)	Transplantat entstammt von einem anderen Menschen	Transplantat entstammt von einer anderen Spezies	Künstlich erstellte Stoffe, wie z.B. Keramiken, Zement oder Polymere

Tab. 1: Klinisch verfügbare Materialien für den Knochenersatz, obere Einteilung nach Ollier

Philips von Walter beschrieb 1821 die erste autologe Knochentransplantation, worauf 1881 Mac Ewen die erste allogene Knochentransplantation beschrieb [Walter 1821, Mac Ewen 1881]. Die Transplantation erfolgte bei einem jungen Mann mit Osteomyelitis des Humerusschaftes. Da die Antibiotikatherapie zu dieser Zeit nicht erschlossen war, entfernte er den infizierten Knochen und implantierte mehrere allogene Tibiadiaphysenstücke. Nach sieben Jahren waren die Transplantate vollständig eingebaut.

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts therapierte der deutsche Transplantationschirurg Lexer die Osteomyelitis und septische Arthritis mittels unbehandelter Knochentransplantaten aus langen Röhrenknochen frisch amputierter Gliedmaßen [Lexer 1908, 1911].

Lexer beschrieb rückblickend einen Erfolg von 50% bei Teil- Gelenks- und Voll-Gelenks- Transplantationen, wobei der Erfolg anhand der Wiederherstellung der normalen Funktion der jeweiligen Extremität bestimmt wurde [Lexer 1925].

Nach Einführung der Antibiotikatherapie in der Osteomyelitisbehandlung änderte sich die Indikationsstellung der Knochentransplantation vor allem in den Bereich der Tumorchirurgie.

Frank Parrish setzte die Arbeiten von Lexer in seiner Therapie von hochmalignen Knochentumoren fort. Er erzielte entsprechende Ergebnisse in der Erhaltung der Extremitäten [Parrish 1973].

Eines der größten Probleme in der Geschichte der Knochentransplantation war jedoch die eingeschränkte Verfügbarkeit des benötigten Materials. Die Möglichkeiten zur Lagerung und Konservierung bestanden noch nicht, so dass man vermehrt auf Transplantate aus Amputationen angewiesen war.

In den 40er Jahren beschrieb Inclan die Möglichkeit der längerfristigen Lagerung von Knochenmaterial durch Kältekonservierung [Inclan 1942].

Bush führte die Ansätze weiter fort und schaffte durch Tiefkühlgeräte erstmals eine Konservierung von Knochentransplantaten über Monate hinaus. Er prägte und definierte auch als erster den Begriff der so genannten „Knochenbank“ [Bush 1947].

Aufgrund der Annahme eines hohen Bedarfs an Knochentransplantaten in Kriegszeiten gründete Dr. George Hyatt als erster Direktor in den 50er Jahren die Navy Tissue Bank in Bethesda, Maryland [Hyatt 1950]. Nach dem Erreichen der Verfügbarkeit von Knochentransplantaten strebte Hyatt im Folgenden danach, die Transplantate günstig und auch über weite Entfernungen transportieren zu können. Dabei führte er das Prinzip der Lyophilisierung in die Knochentransplantation ein, die sowohl den Transport als auch die Lagerung über Jahre ohne Kühlung ermöglichte [Hyatt 1952].

Nach dem Erreichen von Knochenbanken und Transportmöglichkeiten stellte sich in den 50er Jahren zunehmend das Problem einer möglichen Infektionsübertragung durch allogene Knochentransplantate. So berichtete 1953 James von Übertragungen von Tuberkulose [James 1953] und wenig später Shutkin von übertragenen Hepatitisinfektionen durch konservierte Knochentransplantate [Shutkin 1954].

Bekannte Risikogruppen mit erhöhter Inzidenz für diese Krankheiten wurden durch das Einsetzen eines Spenderscreenings für die Knochenspende ausgeschlossen.

Dem Spenderscreening sowie der Weiterentwicklung der Knochentransplantatbehandlung kam gerade nach der ersten bekannt gewordenen HIV – Übertragung durch ein Knochentransplantat im Jahr 1984 eine noch größere Bedeutung zu [CDC 1988], zumal HIV zu dieser Zeit nicht durch einen Bluttest diagnostiziert werden konnte. Obwohl die Screeninguntersuchungen bei Knochenspendern insbesondere bei möglichen HIV – Infektionen in den darauf folgenden Jahren intensiviert wurden, kam es nicht nur zu weiteren HIV – Übertragungen in 1992 [Simonds 1992] und 1996 [Schratt 1996], sondern auch zu beschriebenen Fällen einer Hepatitis – C – Übertragung durch allogene Knochentransplantate [Eggen 1992, Conrad 1995].

Fortan stellte die Elimination von Krankheitserregern sowie ein optimierte Screeningverfahren bei Knochenspendern eine der Hauptaufgaben in der Forschung dar.

1.2 Knochentransplantation aus heutiger Sicht

Die operative Behandlung von Knochendefekten aufgrund von Frakturen, Pseudoarthrosen, Zysten oder auch malignen Prozessen stellt heutzutage eines der größten Probleme in der modernen rekonstruktiven Chirurgie dar. Zu diesem Zweck und um die physiologische Funktion des betroffenen Skelettabschnitts wieder herzustellen, stellt die Verwendung von autologen, allogenen Knochentransplantaten sowie die Verwendung von Knochenersatzmaterialien ein unverzichtbares Therapieverfahren dar [Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer 1996].

In Deutschland geht man von jährlich 75.000 autologen und circa 30.000 allogenen Knochentransplantationen aus [Richtlinie 2004/23/EG des Europäischen Parlaments von 2004]. In den USA finden sogar zwischen 650.000 und 800.000 Knochentransplantationen pro Jahr statt [CDC 2002].

Eine entscheidende Rolle im späteren Heilungsprozess kommt der richtigen Wahl eines geeigneten Knochenmaterials zu. Daher formulierten v. Garrel Anforderungen an einen Knochenersatz, die im Idealfall erfüllt sein sollten [v. Garrel 1998]. Dieses Material darf beim Empfänger weder immunologische Abstoßungsreaktionen hervorrufen noch toxisch oder mutagen wirken. Voraussetzung ist die Sterilität. Es soll sich in die Knochenstruktur integrieren und den Umbau der Knochenstruktur durch Revaskularisation und Wachstumsfaktoren fördern. Man spricht hierbei von einer osteokonduktiven Wirkung des Materials. Auch die Fähigkeit zur Induktion und Beschleunigung der Knochenneubildung, also der Osteoinduktion, wird als wichtig erachtet. Zudem stellen bestimmte mechanische Voraussetzungen des Knochenersatzes die Grundlage für eine stabile Osteosynthese und die mechanische Belastbarkeit. Des Weiteren sollte das Material in jeglicher Form und Größe verfügbar und einfach zu bearbeiten sein. Zudem stellen uneingeschränkte Reproduzierbarkeit bei niedrigen Kosten weitere wesentliche Voraussetzungen dar.

Bis heute ist allerdings noch kein Material in klinischer Anwendung oder überhaupt bekannt, dass diesen Anforderungen in ihrer Gesamtheit gerecht wird, so dass die Grundlagenforschung nach alternativen Knochenersatzmaterialien einen zentralen Stellenwert einnimmt.

1.3 Knochenersatzmaterialien

1.3.1 Autologe Knochentransplantation

Seit Jahrzehnten gilt die Verwendung von autologen Knochentransplantaten als Goldstandard in der Behandlung von Knochendefekten. Dies erklärt sich zum einen an den erhalten bleibenden osteogenen Eigenschaften des Transplantats im Hinblick auf die nachfolgende Knochenregeneration. Zum anderen finden keine immunologischen Abstoßungsreaktionen statt, die neben einem geringeren Infektionsrisiko eine schnelle Einheilung und Revaskularisierung des Transplantats mit sich bringen. Bei der Verwendung autologer Transplantate besteht ein weiterer Vorteil darin, dass osteoinduktive Proteine und Wachstumsfaktoren in physiologischer Anzahl vorhanden sind [Bolander 1986].

Dennoch sieht sich die autologe Knochentransplantation auch vielen Nachteilen gegenübergestellt, so dass die Suche nach alternativen Materialien weiterhin von großer Bedeutung ist.

Die Gewinnung der Transplantate, meist aus dem Beckenkamm desselben Patienten, birgt die Gefahr erhöhter Komplikationen. Durch den Zweiteingriff sind insbesondere Kinder, ältere Patienten und Patienten mit reduziertem Immunsystem von der erhöhten Komplikationsrate betroffen. Neben allgemeinen Komplikationen wie einer verstärkten postoperativen Schmersymptomatik [Greenwald 2001],

Taubheitsgefühle im Narbenbereich oder auch kosmetischen Beeinträchtigungen werden auch schwerwiegende Komplikationen beschrieben, wie z. B. Beckenfrakturen [Guha 1983, Ubhi 1984], Pseudoaneurysmen der A. glutea superior verbunden mit einer Urethraverletzung [Catinella 1990] und Herniationen von Beckeninhalten durch die Entnahmestelle [Bosworth 1955, Challis 1975, Hamad 1989]. Ein zusätzlicher Nachteil besteht in der eingeschränkten Verfügbarkeit, gerade bei größeren Knochendefekten.

1.3.2 Allogene Knochentransplantation

Wie bereits erwähnt bezeichnet man ein Gewebe als „allogen“, sofern es von Individuen der gleichen Spezies, also von Menschen, stammt. Damit besitzen allogene Knochentransplantate gegenüber den autologen Transplantaten den großen Vorteil, dass sie relativ unbegrenzt verfügbar sind. Das Material wird dabei meist im Rahmen von Hüftgelenksresektionen bei Totalendoprothesen oder von Organspendern gewonnen. Daraus resultiert ein weiterer Vorteil der allogenen Transplantate. Durch den Wegfall eines Zweiteingriffs im Sinne einer Knochenentnahmeoperation besteht eine herabgesetzte postoperative Morbidität im Vergleich zu autologen Transplantaten.

Ähnlich den autologen Transplantaten weisen allogene Knochentransplantate eine hohe Potenz an osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften auf. Verschiedene Wachstumsfaktoren, Subtypen der „bone morphogenetic proteins“ (BMP) sind hier mit entscheidend [v. Garrel 1998]. Diese Eigenschaften sind jedoch stark vom Alter des Spenders abhängig und nehmen ab dem 40. Lebensjahr signifikant ab [Jergesen 1991, Nicolas 1994].

Ein weiterer Nachteil stellt das Problem der immunologischen Abstoßungsreaktion dar [Patka 1998].

Trotz eines intensiven Spenderscreenings und einer Aufarbeitung der Gewebeproben vor ihrer Verwendung besteht bei allogenen Knochentransplantaten dennoch die Möglichkeit einer Übertragung mit dem HI – Virus oder auch mit Hepatitis – B – Viren [Kakaiya 1991, Buck 1989]. Um die Sicherheit der Transplantate in einem verantwortungsvollen Rahmen zu gewährleisten, ist die Organisation einer Knochenbank unausweichlich [v. Garrel 1998, Veen 1991], die wiederum mit einem deutlichen Anstieg der Kosten verbunden ist [Doppelt 1981].

Aus dieser Ausführung wird ersichtlich, dass auch allogene Knochentransplantate keineswegs die Voraussetzungen eines idealen Knochenersatzes erfüllen und somit die Grundlagenforschung nach alternativen Materialien bestärken.

1.3.3 Xenogene Knochentransplantation

Die Vorteile der xenogenen Knochentransplantate liegen zum einen in ihrer nahezu unbegrenzten Verfügbarkeit und zu anderen in ihrer kostengünstigen Beschaffung, da sie meist von den in großer Menge vorhandenen Nutztieren wie Rinder und Schweine gewonnen werden. Ähnlich den allogenen Transplantaten stellen sich jedoch vermehrt Probleme der Infektionsübertragung, gerade nach dem Auftreten der BSE – Problematik, die noch nicht suffizient mit Medikamenten therapierbar ist [Vidal – Ragout 2000]. Auch immunologische Abstoßungsreaktionen auf Grund der unterschiedlichen Spezies von Empfänger und Spender sind entscheidende Nachteile der xenogenen Knochentransplantation.

Da sämtlich zelluläre Bestandteil vor der Verwendung der Transplantate entfernt werden, besitzen xenogene Transplantate lediglich eine osteokonduktive Eigenschaft. Im Tierversuch konnte eine direkte Anlagerung neu gebildeten Knochens an xenogene Implantate nachgewiesen werden[Wetzel 1995].

1.3.4 Künstliche Knochentransplantate

Künstlich hergestellte, auch alloplastisch genannte, Knochentransplantate stellen die vierte Gruppe der zurzeit zur Verfügung stehenden Möglichkeiten in der Transplantatchirurgie dar. Industriell hergestellt besteht eine nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit, bei jedoch zum Teil hohen Kosten. Auch der nicht benötigte Zweiteingriff beim Patienten sowie eine fehlende immunologische Abstoßungsreaktion bedeuten ein hohes Maß an Sicherheit für den Patienten und rechtfertigen so den Stellenwert, den alloplastische Materialien einnehmen. Auch im Bereich der mechanischen Belastbarkeit konnten zum Teil befriedigende Ergebnisse erzielt werden. So ergab sich in der Belastbarkeit zwischen autogenen Transplantaten und alloplastischen Implantaten bei der Defektauffüllung im Bereich des Tibiaplateaus kein signifikanter Unterschied. [Buchholz 1989].

Die ursprünglich reine osteokonduktive Wirkung der alloplastischen Materialien kann durch die Kombination mit „bone morphogenetic proteins“ (BMP) noch mit osteoinduktiven Eigenschaften ergänzt werden [Terheyden 1997, 1999; Warnke 2006].

1.4 Zytokine

Zytokine sind Polypeptide mit einer Größe von 10 kDa bis 25 kDa. Sie werden von einer Vielzahl von verschiedenen Zellen gebildet und haben als Wachstumsfaktoren und Botenstoffe besonders bei der Immunantwort und bei Reparaturvorgängen eine zentrale Bedeutung. Je nach ihrer Funktion lassen sich die Zytokine in bestimmte

Gruppen einteilen, wie z.B. Interleukine, Chemokine, Interferone, Tumor – Nekrose – Faktoren, Kolonie Stimulierende Faktoren und Wachstumsfaktoren [Durum 1998]. Zytokine wirken bereits in picomolaren Konzentrationen, was unter anderem auf die hohe Rezeptoraffinität zurückzuführen ist. Das Wirkspektrum der Zytokine kann autokrin (Wirkung auf die zytokinproduzierende Zelle selbst), parakrin (Wirkung auf Zellen in der Nähe der produzierenden Zelle) oder auch systemisch bzw. endokrin erfolgen. Dabei sind Zytokine in der Lage auf verschiedene Zellarten mit gleichen oder unterschiedlichen Effekten zu wirken (Pleiotropismus) [Zinkernagel 1998].

Die Wirkung der Zytokine beschränkt sich jedoch nach heutigem Kenntnisstand nicht nur auf ihre Wirkung bei der Immunreaktion, sondern hat auch Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Zytokine im Einzelnen beschrieben und ihr Wirkspektrum im Rahmen des Knochenstoffwechsels vorgestellt.

1.4.1 Tumor – Nekrose – Faktor α (TNF – α)

Der Tumor Nekrose Faktor gehört zur Gruppe der proinflammatorischen Zytokine und besteht aus zwei verwandten Polypeptiden (α und β). Der Begriff Tumor Nekrose Faktor (TNF) wurde in der Literatur erstmalig im Jahr 1975 aufgeführt [Carswell 1975].

TNF- α und TNF- β haben beide generell das gleiche biologische Wirkspektrum, da sie beide an den gleichen Rezeptor binden, jedoch werden sie auf unterschiedlichen Wegen induziert [Flad 1997].

Synthetisiert wird TNF- α von den meisten Zellen des menschlichen Zellen, vor allem jedoch von Monozyten, Makrophagen, Natürliche Killerzellen, Lymphozyten sowie neutrophilen Granulozyten.

Dabei besitzt es ein Molekulargewicht von 17 kDa und hat eine Länge von 157 Aminosäuren.

Die Synthese wird von vielen verschiedenen Stimuli induziert, wie den Lipopolysacchariden von gramnegativen Bakterien [Okada 1998]. Des Weiteren auch durch andere Wachstumsfaktoren und Zytokine wie zum Beispiel IL- 1, GM-CSF oder auch TNF- α selbst.

Die Wirkung auf den Knochenstoffwechsel beruht auf einer Initialisierung der Osteoklastenaktivität und somit einer erhöhten Knochenresorption [Bertolini 1986]. Ferner stellt TNF- α einen starken Inhibitor der Kollagenbiosynthese dar [Bertolini 1986].

Es zeigte sich aber, dass der TNF- α keine direkte knochenresorptive Eigenschaft in alleinigen Osteoklastenkulturen entwickelt. Dazu war die Anwesenheit von Osteoblasten erforderlich [Thomson 1987].

Neben diesen Wirkungen auf den Knochenstoffwechsel ist TNF- α ein sehr wichtiger Promoter bei der Entstehung von Fieber und des Endotoxinschocks.

1.4.2 Interleukin – 6 (IL – 6)

IL – 6 ist ein multifunktionelles Zytokin, das ein großes und vielfältiges Wirkspektrum auf unterschiedliche Zellarten aufweist. Die Synthese findet in erster Linie in Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten oder aktivierten T – Zellen statt [Peter 1996]. Aber auch ausgereifte Osteoblasten setzen IL – 6 frei [Dodds 1994].

Neben zahlreichen Funktionen in der Immunologie und Hämatopoese spielt Interleukin – 6 als Akut – Phase – Protein und Mediator auch eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel. Über eine erhöhte Proliferation von Osteoklasten besitzt es eine knochenresorptive Wirkung zum einen [Jilka 1992] und vermittelt zum anderen

osteoklastogenen Effekte von $\text{TNF} - \alpha$ [Devlin 1998]. Zudem besitzt IL – 6 in Kombination mit seinem löslichen Rezeptor eine aktivierende Wirkung auf Osteoklasten [Suda 1995] und einen stimulierenden Effekt auf Osteoklasten – Vorläuferzellen (IL – 6 ~ Osteoklasten stimulierender Faktor = OSF) [Roodman 1992].

Ferner zeigte sich, dass kultivierte Osteoblasten durch die Anwesenheit von IL – 6 in ihrer Differenzierung gehemmt werden [Tsangari 2006].

In der Entwicklung von Osteoklasten- Progenitor- Zellen im Knochenmark scheint IL – 6 keine Rolle zu spielen [Jilka 1992].

1.4.3 Interleukin – 8 (IL – 8)

Die Herstellung von IL – 8 findet hauptsächlich in stimulierten Monozyten statt, nicht jedoch in gewebständigen Makrophagen und T – Lymphozyten. Interleukin – 8 wird ferner von Makrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen produziert. Stimuliert wird seine Synthese durch Interleukin – 1 und den Tumor – Nekrose – Faktor α . Eine Hemmung findet statt durch Glukokortikoide und $\text{TGF} - \beta$.

Im Gegensatz zu anderen Zytokinen kann IL – 8 spezifisch neutrophile Granulozyten aktivieren. Sehr hohe Konzentrationen von IL – 8 finden sich in Psoriasissschuppen, möglicherweise durch die hohe Aktivität dieser Zellen [Gearing 1990].

In Bezug auf den Knochenstoffwechsel wird ein direkter Effekt von Interleukin – 8 auf die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten diskutiert [Bendre 2003].

1.5 MG63 (Osteoblasten like cells)

MG63 beschreibt eine Zellreihe, die als Osteoblasten like cells beschrieben wird [Billiau 1977]. Sie sind wie die Zellreihen MC3T3-E1 und SaOS-2 den humanen Osteosarkomzelllinien zugehörig. Neben humanen Osteoblastenzellkulturen und humanen Knochenmarksstammzellen sind auch sie seit Jahren Gegenstand von Zellkulturexperimenten in vitro.

Ursprünglich wurden MG63–Zellen aus dem Sarkom eines 14 jährigen kaukasischen Patienten isoliert und als Monolayerkulturen etabliert. Ihre Kultivierung erfolgte nach Spülung, Gewebedissektion, enzymatischer Zellseparation und Zentrifugation. Nach weiterer Subkultivierung erhält man homogene Zellpopulationen, welche ihre funktionellen Eigenschaften auch über längere Kultur- und Passagezeiträume behalten.

An dieser Stelle sei ausdrücklich darauf hingewiesen, dass ein transformierter Phänotyp, wie der der MG63–Zellen, nicht mit einer nativen Primärkultur, beispielsweise einer nativen Osteoblastenkultur, zu vergleichen ist und die Ergebnisse der in vitro Untersuchungen nicht übertragen werden können. Dies gilt hier im Besonderen in Bezug auf das untersuchte Zellwachstum. Nicht transformierte Zellen, wie sie bei Osteoblasten- oder Knochenmarkskulturen vorkommen, stellen in vitro ihre Teilungsfähigkeit ein, nachdem sie einen einschichtigen Zellrasen, sog. Monolayer, ausgebildet haben. Im Gegensatz dazu wachsen transformierte Zellen nach Erreichen von Konfluenz aus der Monolayer–Formation unbegrenzt weiter und erreichen mehrschichtige dreidimensionale Verbände. Dieses charakteristische Phänomen wird als Multilayer bezeichnet.

Primärzellen werden unter bestimmten Bedingungen angeregt, Multilayerverbände auszubilden. So konnten diese in Anwesenheit von TGF-beta 1 bei einer kultivierten Osteoblastenkultur elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. [Lee 2006].

Primäre Osteoblasten von Ratten zeigten in vitro unter dem Einfluss von BMP (bone morphogenetic protein) neben einer konfluierenden Multilayerstruktur zusätzlich Konzentrationen an Osteocalcin und alkalischer Phosphatase [Saad 2009]. Bone morphogenetic proteins (BMP) stellen dabei potente lokale Faktoren für die Induktion oder Stimulation der Knochenformation dar [Wozney 1998]. Sie konnten in verschiedenen Zellkulturen in vitro die Differenzierung von Osteoblasten demonstrieren [Chen 1997].

Die MG63-Zellen zeichnen sich durch schnelles Wachstum mit hoher Verdopplungsrate von 38 Stunden und dem Fehlen von Kontaktinhibitoren, d.h. einem Teilungs- und Wachstumsstopp nach Erreichen der Konfluenz aus. [Heremans 1978].

Ein wichtiger Grund für dieses Wachstumsverhalten ist die höhere Menge an „transforming growth factor“ (TGF- β), den diese Zellen bilden. TGF- β stimuliert die Synthese von Fibronectin und Kollagen, womit sich lokal eingeschränkt, die Zellen eine extrazelluläre Matrix schaffen, die ihr Anheften zu größeren, traubenartigen Verbänden ermöglicht.

Fibronectin besitzt dabei eine Brückenfunktion zwischen Kollagenfibrillen und Molekülen aus der extrazellulären Matrix und dient des Weiteren als Adhäsionsmolekül für sich ausbildende Zellen. Transformierte Zellen teilen sich weitgehend unabhängig von der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren, wohin gegen diese Wachstumsfaktoren (z.B. epidermal growth factor oder plated-derival growth factor) nicht transformierten Kulturzellen durch fetales Serum (in der Regel FBS) hinzugefügt werden müssen. Transformierte Zellen dagegen produzieren viele der essenziellen Faktoren und steuern damit von außen unkontrolliert ihr eigenes Wachstum [Rolle, Mayr 2002].

Da MG63-Zellen schon seit Jahren Gegenstand von Zellkulturstudien sind, sind ihre Eigenschaften und Handhabung ausreichend bekannt, was zu einem hohen Maß an Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit bei der Verwendung in Studien führt. Durch ihren kommerziellen Vertrieb sind sie zudem in nahezu unbegrenzter Menge

verfügbar. Da es sich bei der vorliegenden Studie in erster Linie um eine deskriptive Analyse des Einwachsverhaltens von Zellen in eine Trägersubstanz handelt, eignen sich transformierte Zellen in diesem Fall gut, da sie eine eher anspruchlose und schnelle Zellkulturanzucht erlauben. Aufgrund ihrer Herkunft als transformierte Sarkomzellen unterliegen sie keinen Passagierveränderungen.

Zusätzlich kann auf einen Ethikantrag, wie er bei der Verwendung von humanen Knochenmarksstammzellen erforderlich, bei Zellkulturstudien mit definierten Zellreihen wie der MG63–Zelllinie verzichtet werden. Dies bietet den Vorteil einer raschen Planung und Durchführung der Versuche.

Im Gegensatz zu den hier verwendeten transformierten Zellen beinhalten primäre Osteoblastenzellkulturen heterozygote Zellpopulationen sowie unterschiedlich nebeneinander entwickelte Zellreifstadien. Trotz dieser Beschränkungen können humane Osteosarkomzellen zum Verständnis der Osteoblastenfunktion beitragen, da sie bestimmte spezifische osteoblastäre Eigenschaften repräsentieren.

Des Weiteren wurden MG63 – Zellen aufgrund ihrer osteoblastischen Eigenschaften für dieses Zellkulturmodell ausgewählt, insbesondere im Hinblick auf die Produktion von Zytokinen und die Möglichkeiten zur Kalzifikation. Verschiedene Zytokine mit osteotrophischen Effekten, wie etwa die hier untersuchten IL – 6 und IL – 8, aber auch IL – 3, IL – 1 β und der macrophage – colony stimulating factor (GM – CSF) werden ebenso von Osteosarkoma – Zelllinien produziert als auch von humanen Osteoblasten und humanen Knochenmarksstammzellen [Chaudhary 1994, Manolagas 1995]. In der Literatur werden verschiedene Möglichkeiten beschrieben die Produktion der Zytokine zu beeinflussen. Chaudhary und Avioli (1994) untersuchten in einer Zellkulturstudie die Effekte des Glukokortikoids Dexamethason auf die Produktion von IL – 8 in MG63 – Zellen, humanen Osteoblasten und humanen Knochenmarkszellen, ausgehend von Tatsache, dass eine IL – 8 Produktion von IL – 1 β und TNF – α induziert wird. Dabei konnten sie nachweisen, dass Dexamethason die durch IL – 1 β und TNF – α induzierte Produktion von Interleukin – 8 in allen untersuchten Zellen signifikant hemmt

[Chaudhary 1994]. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Glukokortikoide in der Kontrolle der Zytokinsekretion von genannten Zellen einen wichtigen Stellenwert besitzen. In einer weiteren in vitro Zellstudie konnte ein direkter Zusammenhang zwischen dem Schilddrüsenhormon Triiodthyronin (T3) und der Produktion von Zytokinen festgestellt werden. So konnten sowohl bei humanen Knochenmarkszellen als auch in MG63 – Zellen unter dem Einfluss von T3 eine erhöhte Produktion von IL – 6 und IL–8 nachgewiesen werden. Diese war zeit- und dosisabhängig zugleich [Siddiqi 1998]. Dieser direkte Einfluss konnte auch bei in vivo Studien nachgewiesen werden. Patienten mit Hyperthyroidismus, welcher mit erhöhten Werten der Schilddrüsenhormone T3 und T4 einhergeht, zeigten erhöhte IL – 6 Konzentrationen im Serum [Salvi 1996].

In der Literatur finden sich keine Angaben über die Möglichkeit zur Kalzifikation von MG63–Zellen unter basalen Bedingungen. Humane Osteosarkoma - Zelllinien wie MG63 und SaOS-2 besitzen im Gegensatz zu humanen Osteoblasten keine basale Produktion von Osteocalcin [Siddiqi 1998]. Zellkulturmodelle verschiedener Autoren konnten jedoch die Fähigkeit zur Produktion osteogener Substanzen durch MG63 – Zellen unter bestimmten Voraussetzungen nachweisen. Franceschi und Bonewald konnten in verschiedenen Studien einen direkten Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ auf MG63 – Zellen nachweisen. Die Zellen reagierten unter dem Einfluss des aktiven Vitamin D_3 Metaboliten mit erhöhter Produktion von alkalischer Phosphatase, Osteocalcin und Kollagen Typ I [Franceschi 1985, 1987, Bonewald 1992]. Dies führte zu der Annahme, dass $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ die MG63 – Zellen zur Differenzierung in einen stärker ausgeprägten osteoblastischen Phänotyp stimuliert. Damit ist auch bei der Verwendung der Osteoblasten like Zelllinie MG63 potenziell die Möglichkeit gegeben eine Kalzifikation im Zellkulturmodell herbeizuführen ohne dabei humane Osteoblasten heranziehen zu müssen.

Diverse Studien konnten in Zellkulturen mit MG63 – Zellen unter Exposition mit $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ einen weiteren Aspekt gewinnen. Die exponierten Zellen wurden auf Oberflächen mit verschieden starker Unebenheit ausgesät. Generell ließ sich

beobachten, dass rauere Oberflächen die phänotypische Expression von MG63 – Zellen eher modulieren können als eine glatte Oberflächenbeschaffenheit. Dies zeigte sich unter anderem in den höheren Osteocalcin – Konzentrationen, die bei Verwendung von rauen Oberflächen gemessen wurden [Martin 1995, Boyan 1998]. Groessner – Schreiber und Tuan (1992) konnten vergleichbare Schlussfolgerungen ziehen. In Kulturen mit Osteoblasten von embryonalen Hühnchen konnten auf rauen Oberflächen deutlich höhere Aktivitäten von ALP gemessen werden, sowie ein damit einhergehend größerer Grad an Kalzifikation in den jeweiligen Kulturen. Diese Studien zeigen, dass die phänotypische Expression der verschiedenen Zellen durch eine stärker ausgeprägte Unebenheit der Oberfläche ein generelles Charakteristikum von osteoblastischen Kulturen darstellt, zu denen nach diesen Erkenntnissen MG63 – Zellen gleichwohl zu zählen sind.

Osteoblast like cells wie die MG63 – Zellen haben des Weiteren einen großen Stellenwert in der Erforschung der Mechanotransduktion [Jones 1995]. Darunter versteht man einen mechanischen extrazellulären Stimulus auf eine Zelle, der zu einer physiologischen Antwort führt. So beeinflussen mechanische Kräfte die Regulation der Knochenstruktur. In Studien konnte gezeigt werden, dass mechanische Reize im physiologischen Maß zu einer positiven Differenzierung von Osteoblasten führt [Jones 1989]. Osteoblasten reagieren beispielsweise mit einer erhöhten Zellteilungsrate auf mechanische Belastung [Jones 1991].

Bei Reizen, die über ein physiologisches Maß hinausgehen, kann es allerdings in umgekehrter Folge auch zu einer Abnahme der Knochenstruktur kommen. Als Beispiel kann auf der einen Seite eine verminderte Knochenneubildung bei Personen, die längere Zeit einer Schwerelosigkeit ausgesetzt waren, herangezogen werden [Morey-Horton 1985] und eine erhöhte Knochenmasse bei körperlich aktiven Menschen auf der anderen Seite [Wronski 1987].

In Studie konnte gezeigt werden, dass MG63 – Zellen ebenso über eine Mechanosensibilität verfügen wie etwa primäre bovine Osteoblasten [Jones 1991].

1.6 Mechanismus der Fortbewegung von kultivierten Zellen

Generell lässt sich die Fortbewegung von kultivierten Zellen in 3 verschiedenen Schritte unterteilen [Elson 1999], welche simultan voneinander stattfinden, ohne dass eine klare Unterscheidung getroffen werden kann, welcher Schritt den Anfang und welcher das Ende des Prozesses darstellt. Am Anfang steht das Hervorragen am vorderen Ende der Zelle. Von diesem Teil ausgehend werden nun neue Adhäsionen zum zugrunde liegenden Substrat ausgebildet. Am anderen Ende lösen sich die Zellen vom Substrat, offensichtlich als Resultat von Kontraktionen des Zellkörpers. Diese Reaktion geht oft mit einem Stoß an Vorwärtsbewegung einher [Chen 1981]. Obwohl das Prinzip mit den genannten Schritten als einfach erscheint, bleibt der genaue Mechanismus in Gänze ungeklärt. Die Wanderung von kultivierten Zellen bedient sich zusätzlicher Mechanismen für die Adhäsion und Deadhäsion. Die Bewegung der Zellen wird durch chemische und physikalische Interaktionen mit der Umgebung bestimmt. Viele verschiedenen Zelltypen bedienen sich chemischer Gradienten für ihre Ausrichtung [Bray 2001].

Einige kultivierte Zellen, wie etwa Fibroblasten, zeigen auch eine Hemmung der Bewegung aufgrund von Kollisionen mit anderen Zellen [Abercrombie and Dunn 1975]. Dieses Phänomen wird Kontaktinhibition genannt. Der Kontakt beendet durcheinander geratenen Bewegungsaktivitäten, während kollidierende Zellen gegenseitig anzuhaften scheinen [Abercrombie and Dunn 1975]. Zellen ohne Kontakt können sich wieder fortbewegen. Eventuell können sich die Zellen voneinander trennen und in andere Richtungen ziehen [Abercrombie and Dunn 1975]. Andere Zellarten wie zum Beispiel Epithelzellen zeigen sogar noch eine stärkere Kontaktinhibition bei der Fortbewegung. Diese Zellen verbleiben im

Kontakt bei folgenden Zellkollisionen. Wiederholte Kollisionen mit zusätzlichen Zellen können dazu führen, dass sich die Zellen in einen zusammenhängenden Zellhaufen entwickeln [Abercrombie and Dunn 1975].

Neben Zell-Zell-Kontakten können andere physikalische Beziehungen Einfluss auf die Fortbewegung von Zellen haben. Kultivierte Endothelzellen, die einer mechanischen Spannung ausgesetzt wurden, sind in der Lage sich selbst in die Richtung der Belastung auszurichten [Naruse 1998]. Mechanischer Stress könnte einen direkten Einfluss auf die Ausrichtung der Zellen bei der Fortbewegung haben.

1.7 Knochenzell- und Vitalitätsmarker

Die im Folgenden aufgeführten Parameter sind Enzyme und Substanzen, die für den Knochenstoffwechsel von entscheidender Bedeutung sind oder durch Stoffwechselvorgänge gebildet werden. Eine Schädigung der Zellmembran kann ebenso zu einer Erhöhung der Parameter führen wie auch eine vermehrte Bildung der Enzyme während Wachstumsvorgängen.

1.7.1 Laktat

Laktat ist ein Produkt, welches bei der anaeroben Glykolyse durch Reduktion von Pyruvat entsteht. Bei ausreichender der kultivierten Zellen mit Sauerstoff wird das anfallende Pyruvat hauptsächlich in den Mitochondrien oxidativ verstoffwechselt. Bei einem Überangebot von Pyruvat oder durch einen Sauerstoffmangel in den Zellen kommt es jedoch leicht zu einem Anstieg des Laktats. Auch ein Abfall des pH

– Wertes führt über die Hemmung der Gluconeogenese zu einem weiteren Anstieg des Laktat – Wertes.

1.7.2 Laktatdehydrogenase (LDH)

Die Laktatdehydrogenase ist ein zytoplasmatisches Enzym und ist ein Indikator für die zellvermittelte Zytotoxizität. Die LDH katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu L – Laktat mit Hilfe von NADH. Die Laktatdehydrogenase stellt einen sehr sensitiven Marker für Membrandefekte, Zelluntergang und Gewebeschäden dar. Allerdings ist er wenig gewebsspezifisch, da die LDH in Form von fünf verschiedenen Isoenzymen vorkommt, die in unterschiedlichen Organen lokalisiert sind, wie z.B. im Herzmuskel, in den Nieren, in Erythrozyten oder auch Leber und Skelettmuskulatur.

1.7.3 Osteocalcin

Osteocalcin, auch als GLA Protein bezeichnet, da es in seiner Primärstruktur drei Gamma – Carboxyglutaminsäurereste (GLA) zeigt, wurde in der Literatur erstmals 1976 beschrieben [Price 1976]. Es handelt sich um ein nicht – kollagenes calciumbindendes Protein bestehend aus 49 Aminosäuren. Damit ist Osteocalcin u.a. für die Überführung von CA – Ionen aus dem Blutplasma in die Verkalkungsbereiche der Knochen von Bedeutung. Osteocalcin wird von Odontoblasten und Osteoblasten während der Mineralisationsphase produziert [Houben 1997]. Nach der Freisetzung aus den Osteoblasten wird ca. 80% des Osteocalcins in die Knochenmatrix eingebaut und ca. 20% werden in die

Blutzirkulation abgegeben [Withold 1996]. Somit besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Serum – Osteocalcin und der Knochenumsatzrate. Es ist jedoch nicht endgültig geklärt, ob Osteocalcin ein Marker der Osteoblastenaktivität oder mehr ein Indikator für den Knochenstoffwechsel und dessen Umsatz an sich ist [Christenson 1997].

Risteli und Risteli (1993) sehen Osteocalcin als einen Marker der Osteoblastenaktivität. Auch Robins und New (1997) sehen die Konzentration des Osteocalcins eher in Relation zur Osteoblastenzahl und –aktivität als in direkter Beziehung zur Knochenmineralisation. Allerdings wird Osteocalcin auch als ein Marker der Knochenmineralisation angeführt [Hiney 2000].

1.8 Fragestellung und Zielsetzung

Im Bereich der Unfall- und Wiederherstellungschirurgie werden seit Jahrzehnten Knochentransplantationen zur Deckung kleinerer Defekte durchgeführt. Dabei zählt der autologe Knochenersatz zum gegenwärtigen Zeitpunkt als Goldstandard. Aufgrund verschiedener Probleme, wie der geringen Verfügbarkeit und des notwendigen Zweiteingriffs, der wiederum mit zahlreichen Komplikationen verbunden sein kann, ist die Suche nach künstlichen Knochenersatzmaterialien weiterhin Gegenstand der Forschung.

Vor diesem Hintergrund sollte diese Studie im Rahmen der Grundlagenforschung als mögliches Modell für weiterführende Versuche einen Ansatz liefern. Ziel dieser Studie war es, anhand einer definierten Osteoblasten ähnlichen Zelllinie, das Einwachsverhalten dieser Zellen in einen resorbierbaren Gelatine – Schwamm zu untersuchen.

Begleitend wurden die Zytokine Interleukin – 8 (IL – 8), Interleukin – 6 (IL – 6) und Tumor – Nekrose – Faktor – α (TNF - α) als Marker für eine stattfindende

Zellvermehrung und einer lokalen Entzündungsreaktion im Verlauf der Studie betrachtet.

Um auf eine mögliche Zytotoxizität der Gelatine – Schwämme schließen zu können und Aussagen zum Zelluntergang innerhalb der Zellkulturen zu treffen, wurde als Marker die Laktatdehydrogenase untersucht.

Hinsichtlich einer möglichen Kalzifikation der Zelllinie wurden als osteogene Faktoren Osteocalcin und Calcium bestimmt.

Abschließend soll diese Studie im Kontext mit anderen Zellkulturstudien sowie Studien hinsichtlich eines potenziellen Knochenersatzstoffes als Trägersubstanz betrachtet werden und eine mögliche Interpretation der Ergebnisse erfolgen.

II. Material und Methoden

2.1 Beschreibung des Testmaterials

2.1.1 Spongostan

Auf der Suche nach einer geeigneten Trägersubstanz für den Versuchsaufbau, wurde Spongostan® untersucht und gewählt. Spongostan® der Firma Johnson & Johnson ist ein steriles Hämostyptikum, das sich seit Jahren in der klinischen Anwendung, besonders in den chirurgischen Disziplinen bewährt hat [Light 1945]. Spongostan® wird auf der Basis gereinigter porciner Gelatine hergestellt und zeigt eine schwammartige Struktur mit gleichmäßiger Porosität, die es erlaubt das 45fache des eigenen Gewichts aufzunehmen (Packungsbeilage Spongostan®, Johnson & Johnson Medical).

Als Trägersubstanz besitzt es die geeigneten Eigenschaften. So ist es bei geringen Kosten in steriler Form kommerziell erhältlich. Dabei zeigt es bei Patienten weder allergische Reaktionen noch andere unerwünschte Nebenwirkungen bei vollständiger Resorbierbarkeit und Biokompatibilität [Paganelli 2006].

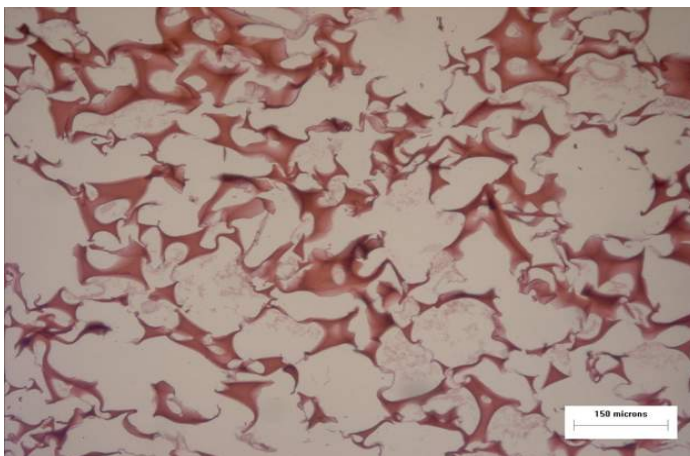


Abb. 1: Histologische Aufnahme eines Spongostan – Schwamms in HE- Färbung bei 100facher Vergrößerung

2.1.2 MG63 – Zellen

Die als „human osteoblast – like cell line“ bezeichneten MG63 – Zellen [Billiau 1977] wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Für diese Studie wurden MG63 – Zellen der 6. und 7. Passage verwendet. Wegen ihrer im Vorfeld beschriebenen Osteoblasten spezifischen Eigenschaften eigneten sie sich als Zellkultur, um die Funktion von Osteoblasten im Versuchsmodell zu untersuchen [Lajeunesse 1990, 1991, Clover 1994].

2.2 Versuchsaufbau

In dieser Studie wurden MG63 – Zellen zur Kultivierung auf der Trägersubstanz Spongostan herangezogen. Dabei wurden zwei verschiedene Kulturschalen verwendet. Für den einen Versuchsaufbau wurden Nunc Zellkulturschalen mit herkömmlichem Boden benutzt. Um eventuelle Rückschlüsse auf eine sauerstoffabhängige Zellproliferation auch am Boden der Zellkulturschale ziehen zu können, wurde der gleiche Versuchsansatz parallel mit der Lumox dish Zellkulturschale durchgeführt. Diese Kulturschale besitzt einen gasdurchlässigen Folienboden, so dass somit die Proliferation der MG63 – Zellen unter dem Spongostan verbessert werden könnte, was es zu prüfen galt.

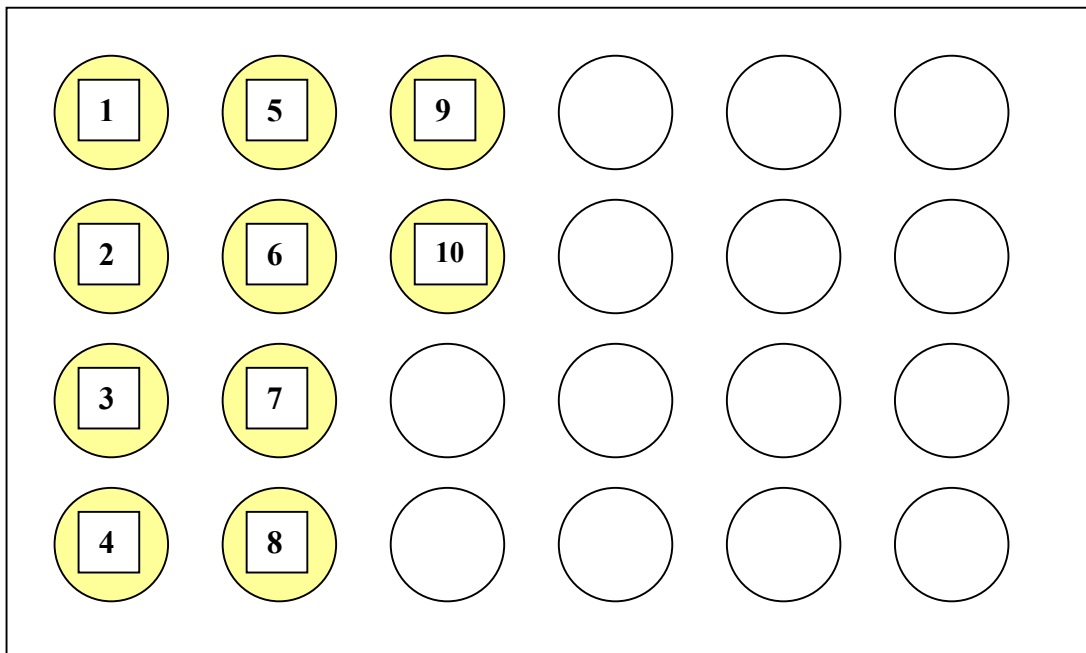


Abb. 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit der Nunc Zellkulturschale mit herkömmlichem Boden.

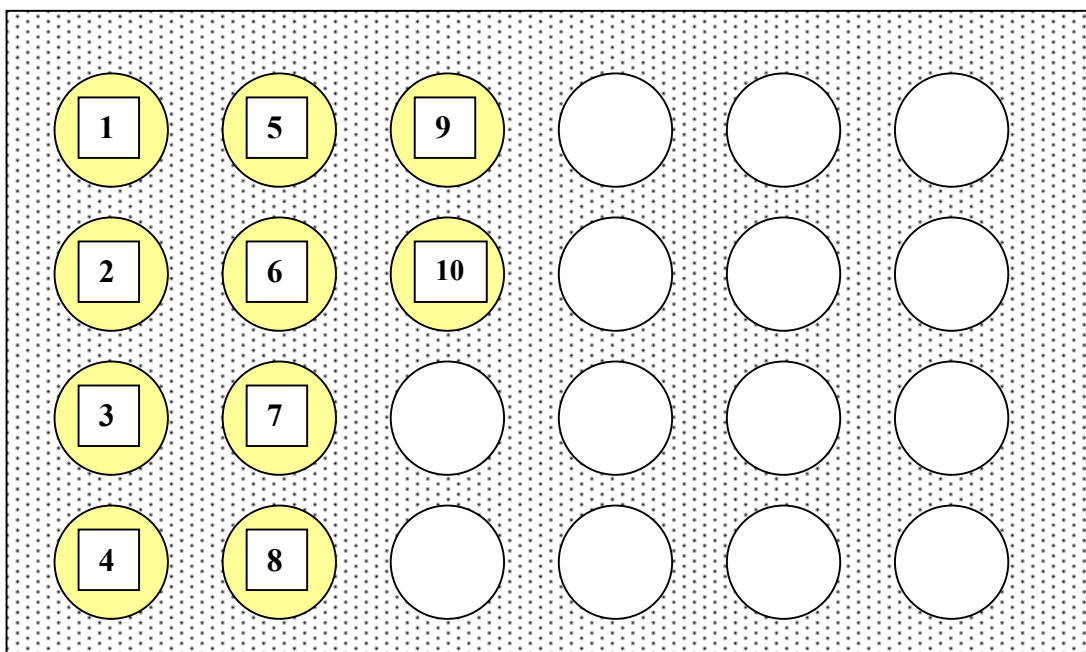


Abb. 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit der Lumox dish Kulturschale mit gasdurchlässigem Folienboden.

Das Spongostan wurde zu Beginn in einheitliche kleinere Schwämme geschnitten, die daraufhin eine Größe von 10 x 10 x 7 mm aufwiesen. Wie dargestellt wurden die Gelatine – Schwämme in 10 Vertiefungen der jeweiligen sterilen 24 well Zellkulturschale eingebracht und anschließend zur Konditionierung mit 100 µl RPMI – 1640 Medium versehen. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde im Brutschrank bei 37° C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit, wurde die hergestellte Zellsuspension in 100 µl Medium auf die Mitte des Spongostan – Schwamms aufgebracht. Die aufgebrachte Zellsuspension entsprach einer Zelldichte von 700.000 Zellen MG63 pro Schwamm. Das Eindringen und Absetzen der Zellen geschah in den folgenden 8 Stunden im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ Begasung. Anschließend wurde vorsichtig am Rand der Kavität 1 ml Medium hinzupipettiert. Die Zellen wurden über den Zeitraum von drei Wochen bei 37° C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in ihrer Kultur gehalten, wobei alle 48 Stunden das verbrauchte Medium gewechselt wurde. Das abgesaugte Medium wurde bei - 80° C tiefgefroren und aufbewahrt. Aus diesen Überständen wurden die Konzentrationen der Zytokine IL – 6, IL – 8 und TNF - α mittels Festphasen – Chemiluminiszenz – Enzymimmunoassay gemessen. Ebenso wurden die Aktivität von Laktat, LDH, Osteocalcin und Calcium gemessen. Nach der Aussaat der Zellen zeigte sich in der mikroskopischen Kontrolle, dass Zellen in die Kulturschale selbst gewandert waren. Daraufhin wurden die Spongostan – Schwämme bei jedem Mediumwechsel in neue Vertiefungen der Kulturschale überführt. Somit wurde versucht zu gewährleisten, dass sich die Analyse der entsprechenden Zytokine und der übrigen bestimmten Marker auf die im Schwamm verbliebenen Zellen und auf die proliferierenden Zellen bezieht.

Parallel dazu wurden als Kontrollgruppen wiederum auf beiden Zellkulturschalen jeweils zwei Kulturen mit verschiedenen Ansätzen beobachtet. Die unten angeführten Darstellungen stellen die Zellkulturschalen mit den jeweiligen Kontrollgruppen schematisch dar.

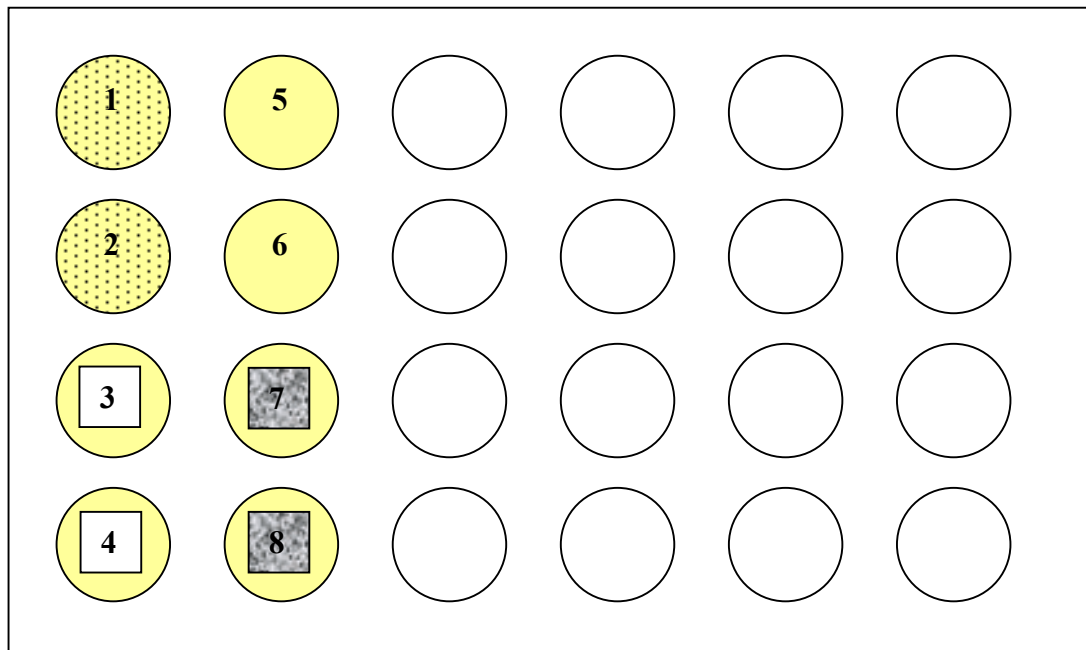


Abb. 4: Schematische Darstellung der Kontrollkulturen mit der Nunc Zellkulturschale mit herkömmlichem Boden.

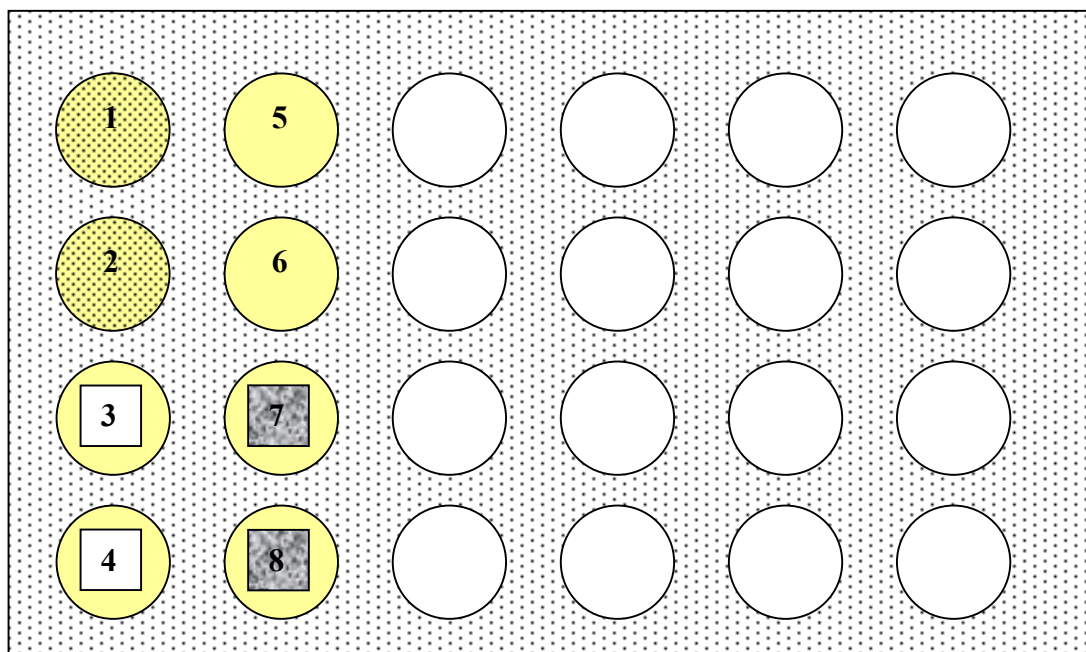


Abb. 5: Schematische Darstellung der Kontrollkulturen mit der Lumox dish Kulturschale mit gasdurchlässigem Folienboden.

In den mit 1 und 2 gekennzeichneten Vertiefungen wurden MG63 – Zellen ohne Spongostan im Medium kultiviert.

Die Vertiefungen 3 und 4 entsprachen dem oben beschriebenen Versuchsaufbau mit dem Unterschied, dass bei diesen beiden Kulturen der jeweilige Spongostan – Schwamm nicht zwischen den Mediumwechsel in neue Vertiefungen überführt wurde. Die Analyse der Zytokine und übrigen Parametern bezog sich dementsprechend auch auf die Zellen, die nach der Aussaat in die Zellkulturschale gewandert waren.

In den Vertiefungen 5 und 6 wurde RPMI 1640 Medium allein kultiviert, um Aufschluss darüber zu erlangen, in wie weit das Medium selbst an den Konzentrationen von Zytokinen beteiligt ist.

Um den Einfluss des Spongostans diesbezüglich verifizieren zu können, wurde in den mit 7 und 8 gekennzeichneten Vertiefungen Spongostan allein ohne den Zusatz von MG63 – Zellen kultiviert.

Für die Kontrollkulturen galten wie oben beschrieben die gleichen Versuchsbedingungen und der gleiche Versuchszeitraum.

2.3 Zellkultur- Medium

RPMI 1640 = Roswell Park Memorial Institute [Moore 1966]

Zu 500 ml RPMI 1640 wurden steril hinzu gegeben:

- 50 ml fetales Kälberserum (FKS)
- 2 mM L-Glutamin
- 3 mg/L NaHCO₃
- 50000/37000 U Penicillin/Streptomycin

2.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Zelllinie MG63 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) käuflich erworben und im Wasserbad bei 37° erwärmt und anschließend in ein Zentrifugenröhrchen, welches 10 ml RPMI 1640 Medium enthielt, gegeben. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 2200 U/min. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml frischem Medium gelöst, in Nunc 250 ml Kulturflaschen ausgesät, und bis zur 6. und 7. Passage vermehrt. Unter Zugabe von Einfriermedium und 20% DMSO wurde die 1. bis 5. Passage tiefgefroren und bei -196° C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Diese Passagen dienten im späteren Verlauf weiteren Zellkulturstudien.

2.5 Kultivieren der Zellen

Die aufgetauten MG63 – Zellen wurden auf Nunc Zellkulturflaschen verteilt und unter Zugabe von weiteren 10 ml RPMI 1640 Medium im Brutschrank bei 37° C, 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit bis zur 6. und 7. Passage kultiviert, um genügend Zellen für die anstehenden Versuche vorrätig zu haben. Unter sterilen Bedingungen wurde das Medium alle 48 Stunden gewechselt. Nach Erreichen der Konfluenz in der 6. und 7. Passage wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült, anschließend erfolgte die Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mittels 3 ml Accutase. Die vollständige Ablösung der Zellen vom Boden wurde lichtmikroskopisch kontrolliert.

2.6 Zellzahlbestimmungen mit dem CASY® - Zellzähler

Um die gewünschten 700.000 Zellen MG63 pro well und Spongostan® - Schwamm gewährleisten zu können, wurde mit dem Zellzähler CASY® 1 TTC gearbeitet.

Dabei besteht das Messprinzip in einer Widerstandsmessung in Verbindung mit einer Signalauswertung. Eine Zellsuspension unbekannter Größe wird in eine Kapillare gesaugt, in der während der Messung eine Spannung angelegt ist. Gemäß dem Volumen der Zellen verdrängen diese eine bestimmte Menge an isotoner Elektrolytlösung (CASYton®).

So wird entlang der Kapillare ein bestimmter Widerstand aufgebaut, über den der Zellzähler die in der Zellsuspension enthaltene Zellzahl ermitteln kann.

Zur Durchführung der Zellzählung wurden 9,950 ml der isotonen Lösung und 50 µl der Zellsuspension in einem Probenbecher gemischt und unter die Messkapillare gestellt. Durch Einstellung der Verdünnung (1:200) und Einstellung des

Messbereichs (abzüglich Debris) konnte die Zellzahl in counts/ml abgelesen werden. Eine entsprechende Verdünnung 700000 Zellen pro 200 µl konnte anschließend errechnet werden.



Abb. 6: Exemplarische Darstellung des CASY® - Zellzähler

2.7 Aufbereitungen zur Histologie

2.7.1 Paraffineinbettung

Die Paraffineinbettung erfolgte im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Standort Marburg. Die Einbettung erfolgte dabei mit Hilfe von einem automatischen Gewebeentwässerungsautomaten (Tissue - Tek® VIP) und einer Ausgießstation (Tissue - Tek® TEC). Der Gewebeentwässerungsautomat arbeitet mit Druck und Vakuum über Nacht nach folgendem Arbeitsprotokoll:

- Formalin	1h 40°C	- Xylol	1h 40°C
- Ethanol 96%	1h 40°C	- Xylol	1h 40°C
- Ethanol 96%	1h 40°C	- Xylol	1h 40°C
- Ethanol 100%	1h 40°C	- Paraffin	45min 60°C
- Ethanol 100%	1h 40°C	- Paraffin	1h 60°C
- Ethanol 100%	1h 40°C	- Paraffin	1h 60°C
- Xylol	1h 40°C	- Paraffin	1h 60°C

Dem automatischen Ablauf ist eine Fixation in 4% gepuffertem Formalin vorausgegangen. Im Anschluss erfolgte das Auswaschen der Präparate und anschließender Entwässerung mit einem organischen Lösungsmittel, in diesem Fall Ethanol. Dem Zusatz des Intermediums (Xylol) folgte die Paraffindurchtränkung. In der Ausgießstation wurden die Präparate abschließend in Paraffin ausgeblockt und auf Kühlplatten ausgehärtet.

2.7.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Aus den für 20 min. bei -20° C vorgekühlten Paraffinblöcken wurden für die lichtmikroskopischen Untersuchungen im Folgenden einzelne Paraffinschnitte mit einer Schichtdicke von 5 µm angefertigt. Das Schneiden der Blöcke erfolgte mit dem Rotationsmikrotom RM 2155 (Fa. Leica, Nussloch). Die entstandenen Schnitte wurden mit einem Pinsel vorsichtig vom Messer des Rotationsmikrotoms aufgefangen und zur Glättung in ein Wasserbad bei 40°C überführt. Die gestreckten Schnitte wurden daraufhin auf Superfrost – Objektträger aus dem Wasserbad aufgezogen und anschließend für 24 Stunden in einem Brutschrank abgeschmolzen.

Die Beschriftung der Objektträger erfolgte entsprechend den Kennzeichnungen der 24 – well – Platten mit ihren jeweiligen Spongostan – Schwämmen.

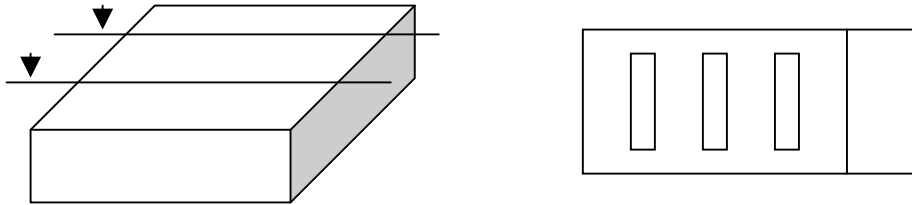


Abb. 7: Exemplarische Darstellung der Schnittführung und der entstandenen Objektträger.

2.7.3 HE – Färbung

Die Hämatoxylin – Eosin – Färbung (HE – Färbung) zählt zu den wichtigsten und am weitesten verbreiteten Routinefärbemethoden in der Histologie.

Für die HE – Färbung wurden die Paraffinschnitte in Xylol entparaffiniert, anschließend einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 50% Ethanol für je 1x5 min) zugeführt. Im Anschluss erfolgte die Kernfärbung in Mayers Hämalaun – Lösung für 5 min. Nach 10 min. bläuen im Leitungswasser und anschließender Gegenfärbung mit Eosin für 5 min wurden die Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe (70%, 90%, 2 mal 100% Ethanol für je 1x5 min) und mit Xylol (2 mal 100%) entwässert.

Abschließend mit Entellan eingedeckelt und zur lichtmikroskopischen Untersuchung bereitgestellt.

2.7.4 Rasterelektronenmikroskopie

Parallel wurden Schwämme mit Zellen über den gleichen Zeitraum kultiviert, um das Zelleinwachsen am Rasterelektronenmikroskop zu untersuchen. Die Primärfixation erfolgte in 3% Glutaraldehydlösung (in 0,1 M Kakodylatpuffer, pH 7,4) bei Raumtemperatur über 45 Minuten. Nach einem dreimaligen Spülvorgang mit 0,1 molarem Kakodylatpuffer über jeweils 5 Minuten wurden die Präparate in 1% Osmiumtetroxidlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur nachfixiert. Im Anschluss an die zweite Fixation wurden die Proben zunächst fünfmal mit deionisiertem Wasser gespült und daraufhin in einer aufsteigenden Ethanolreihe (35%, 50%, 70%, 95%, 100%, 100%) für jeweils 10 Minuten entwässert. Eine bequeme und effizientere Variante der Trocknung der Proben im Vergleich zur früher angewandten Critical Point Kammertrocknung ist die Anwendung von Hexamethyldisilazane (Polysciences) für 10 Minuten und anschließender Trocknung bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Proben im Sputter – Coater für 2 Minuten bei 20 mA mit Gold bedampft. Die goldbeschichteten Schwämme wurden in das Rasterelektronenmikroskop eingeschleust und das Zellwachstum an verschiedenen Stellen der Schwämme untersucht. Dabei wurden die obere, die seitliche und die untere Fläche der Spongostan® - Schwämme untersucht und mit einer Digitalkamera aufgenommen. Die dargestellten Bilder sollen als exemplarische Übersicht dienen.

2.8 Messungen der Zytokine

Aus den Überständen der Zellkulturen wurden die Konzentrationen der Zytokine IL – 6, IL – 8 und TNF - α mittels Festphasen – Chemiluminiszenz –

Enzymimmunoassay (IMMULATE® 1000 systems, Fa Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, USA) gemessen. Ähnlich wie konventionelle ELISA – Verfahren wird dieses Verfahren zur Bestimmung von Zytokinen in der klinischen Diagnostik angewandt.

Die Wahrnehmungsgrenze besteht für IL – 6 bei 2 – 1000 pg/ml, für IL – 8 bei 2 – 7500 pg/ml und für TNF – α bei 1,7 – 1000 pg/ml. Da die Werte den Meßbereich zum Teil überschritten, wurden die entsprechenden Proben mit einer Verdünnungslösung (Assay diluent) 1:20 und 1:50 verdünnt.

Spezifische, an alkalische Phosphatase gekoppelte Antikörper werden in den Testseren inkubiert und binden kompetitiv oder nach dem Sandwichprinzip an die Antikörper der Festphase. Nach einem Waschvorgang wird ein luminogenes Substrat der alkalischen Phosphatase hinzugefügt. Das entstehende, instabile Spaltprodukt emittiert bei seinem spontanen Zerfall Photonen, die von einem Photomultiplier detektiert werden.

2.9 Bestimmung der Enzyme und Vitalitätsmarker

Aus den eingefrorenen Medien wurden die Enzyme Laktat und Laktatdehydrogenase bestimmt sowie Osteocalcin und Calcium. Den Leerwert lieferte jeweils eine Messung der Proben, die nur aus Medium bestanden.

2.9.1 Laktat – Bestimmung

Das Laktat der Proben wurde im Zentrallabor mittels Synchron® - Systeme (Fa. Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) bestimmt. Bei der Assay – Reaktion wandelt

Laktatoxidase Laktat in Pyruvat um, bei gleichzeitiger Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Das entstandene H_2O_2 reagiert bei Katalysierung durch Peroxidase mit Dichlorbenzolsulfonsäure (DCBSA) und 4 – Aminoantipyrin (4 – AAP) zu einem Chromophor. Die Bestimmung der Milchsäure – Konzentration erfolgt durch Messung der durch das Chromophor bewirkten Extinktion mittels einer Endpunkt – Methode. Das System überwacht die Extinktionsänderung bei 520 nm. Die Kalibration des Geräts erfolgte alle 7 Tage durch Synchron® Systeme Multi – Kalibrator. Die Kontrolle des Geräts erfolgte täglich.

2.9.2 Messung der Laktatdehydrogenase (LDH)

Die Bestimmung der LDH – Konzentration erfolgte ebenfalls im Zentrallabor an Synchron® - Systeme (Fa. Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA). Dabei wurde die Aktivität der Laktatdehydrogenase photometrisch bei 340 nm im Reaktionsgemisch ermittelt, welche durch die NADH – Bildung während der Umwandlung von Laktat zu Pyruvat durch LDH zustande kommt. Das Gerät wurde alle 14 Tage mit dem Synchron® - Enzym – Validator – Set kalibriert und täglich kontrolliert.

2.9.3 Bestimmung von Osteocalcin

Die Konzentrationen von Osteocalcin wurden im Zentrallabor am Elecsys 2010 (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) bestimmt. Die Durchführung erfolgte mittels

Elektro-Chemi-Lumineszenz – Immuno-Assay (ECLIA) nach dem Sandwichprinzip, bestehend aus zwei monoklonalen Antikörpern, die spezifisch gegen Epitope auf dem N-MID Fragment und dem N – terminalen Fragment gerichtet sind. Damit erfasst der Test das stabile N-MID Fragment sowie das intakte Osteocalcin. Der Test ist unabhängig vom instabilen C – terminalen Fragment des Osteocalcin – Moleküls und gewährleistet dadurch konstante Messergebnisse unter Routinebedingungen im Labor.

2.9.4 Bestimmung von Calcium

Die Bestimmung der Calcium – Konzentration aus den Medien erfolgte im Zentrallabor mittels Synchron® - Systeme (Fa. Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA). Das System bestimmt dazu die Gesamtcalcium – Konzentration durch indirekte Potenziometrie mittels einer calciumionenselektiven Elektrode in Verbindung mit einer Natrium – Referenzelektrode. Die Calciumelektrode misst im Prinzip die ungebundenen freien Calciumionen in der Lösung. Die Kalibration erfolgte alle 24 Stunden durch Synchron® - Systeme Aqua Cal 1 und 2. Eine Kontrolle des Geräts wurde täglich durchgeführt.

2.10 MTT – Proliferationsassay

Der MTT – Proliferationsassay ist ein Zytotoxizitätstest, bei dem die Zellen mit dem namens gebenden gelblichen Tetrazoliumsalz MTT (3 – (4,5 – Dimethylthiazol – 2 –

yl) – 2,5 – diphenyltetrazoliumbromid) behandelt werden. Das Wirkprinzip dieses Tests basiert auf der Messung der mitochondrialen Aktivität der Zellen. Das gelbliche MTT wird überwiegend durch mitochondriale Dehydrogenasen in das violette kristalline Produkt MTT – Formazan umgewandelt. Nach der Zugabe von Isopropanol wird das Formazan durch Aufbruch der Zellen in Lösung gebracht. Durch photometrische Messungen können im Anschluss Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten der Zellen gezogen werden.

Der Versuchsaufbau erfolgt in 96 – well – Platten. Dazu wurden am 1. Tag pro well die Zellen mit einer Konzentration von 5000 MG63 – Zellen in 100 µl RPMI – Medium 1640 in zwei 96 – well – Platten ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Vorangegangen war die Inkubation des Spongostan®, welches in einer bestimmten Menge Medium (1 ml) ausgesetzt wurde. Alle 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und das verbrauchte Medium eingefroren. So entstanden Mediumproben von 8 folgenden Tagen. Diese wurden dann in je einer Reihe (8 Proben) auf die Zellen in einer 96 – well – Platte aufgebracht, um zu sehen wie sie unter Einfluss der ausgelösten Substanzen des Spongostans® reagierten. Am 2. Tag erhielten die Zellen 100 µl ihres spezifischen Austest – Mediums und Kontrollmedium. Der 3. Tag diente der Proliferationsphase. Am 4. Tag wurde jedes well zusätzlich mit 100 µl MTT – Lösung (5mg/ml MTT-powder in PBS, steril filtriert, verdünnt mit Medium ohne Serumzusatz im Verhältnis 1:10) in einer Konzentration von 5 mg/ml befüllt. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 4 Stunden wurde der Überstand aus den Vertiefungen vorsichtig abgesaugt. Um die in den Zellen gebildeten Kristalle in eine homogene Lösung zu überführen wurde eine Lösung (99,4 ml DMSO, 0,6 ml Essigsäure (100%), 10 g SDS) hinzugegeben und für eine halbe Stunde inkubiert.

Anschließend wurde die OD bei einer Wellenlänge von 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm mit einem ELISA – Reader gemessen.

2.11 Liste der verwendeten Materialien und Geräte

Zellkultur

PBS	Biochrom AG, Berlin
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
L - Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
RPMI 1640 Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Spongostan® Standard (70x70x10 mm)	Johnson& Johnson medical limited, New Brunswick, USA
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
MG63 (human, Osteosarkom)	ATCC, Vertrieb: LG Promochem, Wesel
MTT - powder	Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, USA
DMSO	Carl Roth GmbH& Co, Karlsruhe
SDS	Carl Roth GmbH& Co, Karlsruhe
Essigsäure	Riedel-de Haën AG, Seelze
Histocomp (Paraffin)	Fa. Vogel, Gießen
Formalin 4% PBS gepuffert	Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, USA
Ethanol	Fa. Merck, Darmstadt
Xylol	Fa. Merck, Darmstadt
Glutaraldehydlösung 3%	Fa. Merck, Darmstadt
Osmiumtetroxidlösung	Fa. Degussa, Frankfurt

Verbrauchsmaterialien

TC – Platten 24 – well, steril	Greiner Bio – One, Frickenhausen
10 ml Pipetten	
Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl	Greiner Bio – One, Frickenhausen
Lumox multiwell 24, TC – Qualität, steril	Greiner Bio – One, Frickenhausen
Filter tip	Greiner Bio – One, Frickenhausen
50 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio – One, Frickenhausen
250 ml Zellkulturflaschen	Greiner Bio – One, Frickenhausen
Objektträger Super Frost® Plus	Menzel – Gläser, Braunschweig
50 ml Einwegspritzen	HMD Healthcare LTD., Horsham, England
Tissue Culture Flasks, non pyrogenic 250 ml, 75 cm ²	Greiner Bio – One, Frickenhausen
Spritzenvorsatzfilter mit 0,2 µm	Schleicher& Schüll GmbH, Dassel
Safe – Lock tubes 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
10 ml in 1/10 ml Cellstar® serological pipette	Greiner Bio – One, Frickenhausen
Barrycidal® 36, Desinfektionsmittel	Vertrieb: Handelsvertretungen Helmut Schröder

Geräte

Brutschrank BB – 16 CU	Heraeus Instruments, Hanau
CASY® 1 TTC, Version SC1 TTC (Zellzähler)	Schärfe Systems GmbH, Reutlingen
CASYton®	Schärfe Systems GmbH, Reutlingen
CASYclean®	Schärfe Systems GmbH, Reutlingen
CASYcups®	Schärfe Systems GmbH, Reutlingen
Laborfuge 400 R	Heraeus Instruments, Hanau
Rotationsmikrotom RM 2155	Fa. Leica, Nussloch
Pipetus – Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
IMMULITE® 1000 systems	Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, USA
Synchron® - Systeme	Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA
Elecsys 2010	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Durchlichtmikroskop, Aristomed	Fa. Leitz, Wetzlar
Tissue - TEK® VIP	Fa. Sakura, Heppenheim
Tissue - TEK® TEC	Fa. Sakura, Heppenheim
Rasterelektronenmikroskop ISI Sx 30	Fa. Leitz, Wetzlar
Sputter Coater S 150	Fa. Edwards, West Sussex, GB

2.12 Abkürzungsverzeichnis

ALP	alkalische Phosphatase
BMP	bone morphogenetic protein
cm	Zentimeter
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FKS	fetales Kälberserum
IL	Interleukin
LDH	Laktatdehydrogenase
mA	Milliampere
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
µl	Mycroliter
PBS	Phosphat buffered saline
pg	Picogramm
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TGF	tumor growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit

2.13 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt. Die statistische Auswertung der Messungen für Osteocalcin, Calcium und die Laktatdehydrogenase erfolgte mit Hilfe des t – Testes für unverbundene Stichproben nach Student. Mit Hilfe dieses Testes können die Werte von zwei unterschiedlichen großen Stichproben miteinander verglichen werden, vorausgesetzt, die Werte folgen der Normalverteilung. Bei diesem Test wird von der Nullhypothese ausgegangen, dass kein Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen besteht. Nach der Analyse wird diese Nullhypothese angenommen oder abgelehnt.

t – test für unverbundene Stichproben

Die Teststatistik berechnet sich aus der Formel: $T = \frac{\bar{Y} - \bar{X}}{S_{\bar{Y} - \bar{X}}}$

Dabei sind T = Prüfgröße

\bar{Y} , \bar{X} = Mittelwerte der Kontrollgruppe bzw. der Probengruppe

$S_{\bar{Y} - \bar{X}}$ = Standardfehler der Differenz

$S_{\bar{Y} - \bar{X}}$ = berechnet sich aus der „gepoolten Varianz“:

$$S_p^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2 + \sum (Y_i - \bar{Y})^2}{m + n - 2}$$

m= Anzahl der Werte in der Kontrollgruppe (m=10)

n = Anzahl der Werte in der Versuchsgruppe (n=10)

$$S_{\bar{Y} - \bar{X}}^2 = s_p^2 \cdot \frac{m + n}{m \cdot n}$$

Eine Signifikanz gegenüber den Kontrollen besteht, wenn der errechnete Wert T über dem „Kritischen Werte“ t für die entsprechende Anzahl der Freiheitsgrade f liegt. Der kritische Wert wird aus einer Tabelle abgelesen und beträgt $t = 2,101$ für das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ und die Anzahl der Freiheitsgrade $f = m + n - 2 = 18$ bzw. $t = 2,282$ für das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ und die Anzahl der Freiheitsgrade $f = m + n = 10$.

Rechenbeispiel:

Laktat – Konzentrationen in mmol/L in den Kulturen, die auf der herkömmlichen Folie kultiviert wurden, am Tag des letzten Mediumwechsel.

Kultur	12. Wechsel
1	8,4
2	8,2
3	8,1
4	7,6
5	11,7
6	8,4
7	7,2
8	7,1
9	10,1
10	7,1

Mittelwert	8,39
Standardabweichung	1,46

$$n = 10$$

$$\bar{Y} = 8,39$$

Laktat – Konzentrationen in mmol/L in den Kulturen, die auf dem gasdurchlässigen Lumox Folienboden kultiviert wurden, am letzten Mediumwechsel.

Kultur	12. Wechsel
1	5,6
2	5,6
3	5,4
4	6,0
5	5,6
6	5,8
7	5,7
8	5,9
9	5,6
10	5,8

Mittelwert	5,7
Standardabweichung	0,17

$$m = 10$$

$$\bar{X} = 5,7$$

$$S_p^2 = 0,613672$$

$$S_{\bar{Y}-\bar{X}}^2 = 0,613672 \cdot \frac{10+10}{10 \cdot 10} = 0,122734$$

$$S_{\bar{Y}-\bar{X}} = \sqrt{0,122734} = 0,3503341$$

$$T = \frac{8,39 - 5,7}{0,3503} = 7,6791322$$

T ist damit größer als der kritische Wert $t = 2,101$. Die ermittelten Laktat – Werte der Kulturen auf den herkömmlichen Kulturschalen sind damit gegenüber den Laktat – Werten der gasdurchlässigen Kulturschalen auf dem 5% Niveau signifikant höher.

Die Werte der Zytokine wurden ebenfalls mit Hilfe des Programms GraphPad Prism statistisch ausgewertet. Da bei den Zytokinen nicht von einer Normalverteilung ausgegangen wurde, erfolgten die statistischen Auswertungen mit Hilfe Mann – Whitney – Test. Dieser Test basiert unter Nichtberücksichtigung einer Normalverteilung auf dem gleichen Prinzip wie der beschriebene t – test unter Einbeziehung von Mittelwerten und Standardabweichungen.

III. Ergebnisse

3.1 Zytokinausschüttung

Während der gesamten Versuchsdauer wurde alle 48 Stunden bei jedem Mediumwechsel der Mediumüberstand mittels Pipette vorsichtig abgenommen und im Tiefkühlschrank bei -80°C gelagert. Die Spongostan – Schwämme wurden anschließend mit einer Pinzette behutsam aus ihrem alten well in eine neues well überführt. Anschließend wurde frisches RPMI 1640 Medium hinzugegeben. Einzig bei zwei Kulturen wurde der Spongostan – Schwamm in seinem vom ersten Tag des Versuches an zugeteilten well nie überführt, um eventuelle Unterschiede zu den anderen Kulturen bezüglich Zytokinfreisetzung oder Zellproliferation im Lichtmikroskop festzustellen.

Die tief gefrorenen Mediumüberstände wurden zur Bestimmung von Zytokinen und den übrigen bereits aufgeführten Werten zur Bestimmung in die Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik - Zentrallaboratorium des Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Standort Marburg gegeben. Dort wurden die Konzentrationen wie beschrieben an den kalibrierten Geräten IMMULITE® 1000 systems für die Zytokine, Elecsys für Osteocalcin und Synchron® - Systeme ermittelt.

Im Folgenden werden die Konzentrationen für Tumor – Nekrose – Faktor α (TNF - α), Interleukin – 8 (IL – 8) und Interleukin – 6 (IL – 6) tabellarisch und graphisch dargestellt. Dabei werden sie zum einen getrennt ihrem unterschiedlichen Versuchsaufbau entsprechend, gasdurchlässiger Folienboden bei der Lumox well plate und herkömmliche well plate mit statischem Boden, und zum anderen in vergleichender Form der beiden Verfahren aufgeführt. Die Wertetabellen und Graphiken der ermittelten Werte sind auf den folgenden Seiten dargestellt.

3.1.1 Tumor – Nekrose – Faktor - α

Vergleich der TNF α Konzentrationen der Kulturen, die auf herkömmlichen Schalen ohne gasdurchlässige Membran kultiviert wurden

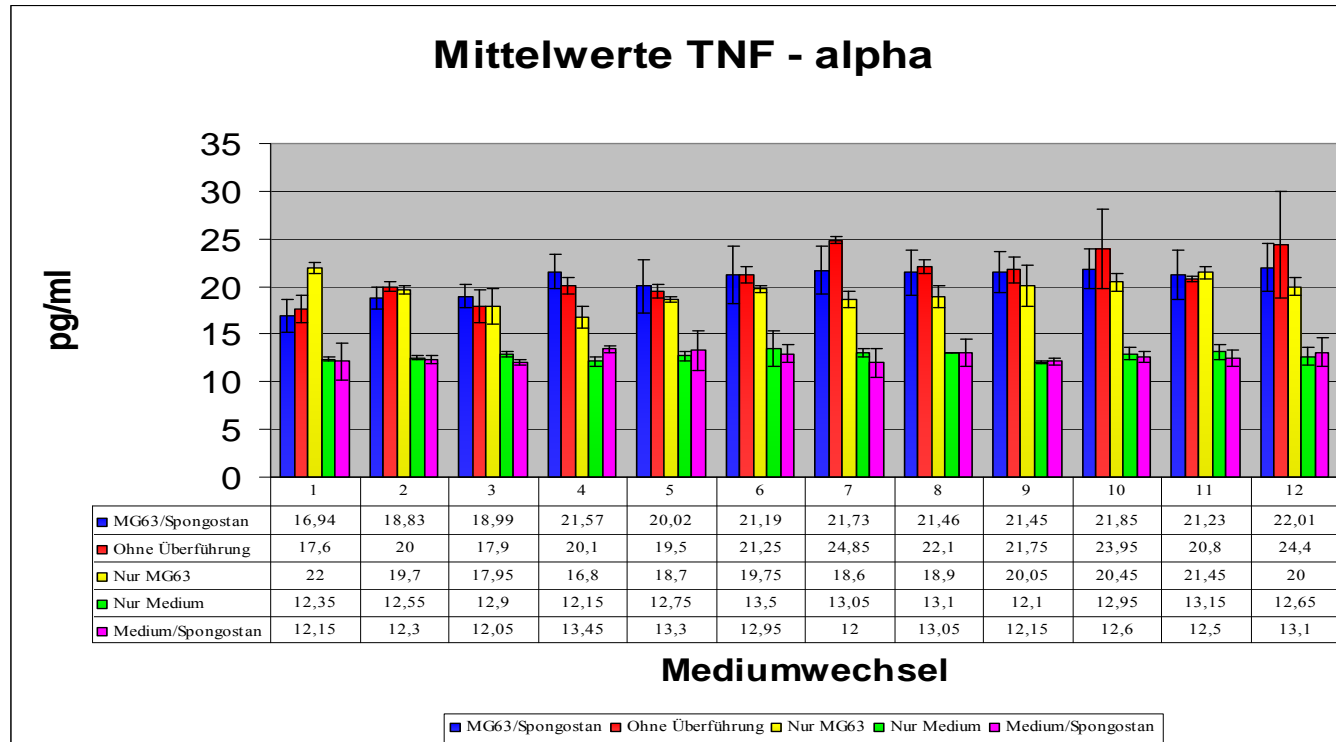


Abb. 8: Mittelwerte der TNF α Konzentrationen auf herkömmlichen Kulturschalen

Ergebnisse

TNF – α Konzentrationen (pg/ml) bei 700.000 MG63/Schwamm ohne gasdurchlässigen Folienboden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	17,4	20,1	19,6	21,1	20,0	20,4	20,5	20,6	20,1	22,6	23,1	21,5
2. Kultur	17,2	19,1	19,7	20,7	13,9	16,8	17,2	16,0	19,8	17,3	16,6	19,1
3. Kultur	15,2	17,9	17,5	18,8	17,0	17,7	18,7	19,9	17,6	19,6	18,2	19,8
4. Kultur	15,0	18,6	16,7	23,0	18,7	18,5	21,6	21,6	20,5	22,5	18,7	21,1
5. Kultur	16,0	19,9	19,3	21,6	22,0	23,9	23,1	22,1	22,0	22,1	22,6	23,3
6. Kultur	19,2	18,0	21,0	21,6	21,9	20,8	22,9	21,0	22,2	22,6	22,7	22,4
7. Kultur	20,2	20,8	18,6	23,1	22,5	26,3	22,8	24,1	24,0	23,2	24,9	26,0
8. Kultur	16,8	18,5	18,3	21,9	20,4	22,3	22,5	23,1	21,4	21,6	21,7	20,0
9. Kultur	17,4	18,5	19,7	24,8	23,0	24,1	26,0	23,6	25,2	24,7	22,8	26,5
10. Kultur	15,0	16,9	19,5	19,1	20,8	21,1	22,0	22,6	21,7	22,3	21,0	20,4

Mittelwert	16,94	18,83	18,99	21,57	20,02	21,19	21,73	21,46	21,45	21,85	21,23	22,01
Standardabw.	1,75	1,16	1,24	1,81	2,81	3,03	2,46	2,33	2,15	2,04	2,59	2,55

Tab. 2: Die Konzentrationen für TNF – α zeigten bei dem Versuchsaufbau mit der herkömmlichen well plate ohne gasdurchlässigen Folienboden einen Anstieg vom 1. Mediumwechsel an. Dieser setzte sich bis zum 4. Wechsel fort. Im Verlauf blieben die Werte auf einem konstanten Niveau zwischen 21 und 22 pg/ml.

Ergebnisse

TNF – α Konzentration (pg/ml) in den Kulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	22,4	20,0	19,3	17,6	18,9	19,5	18,0	19,7	21,6	21,1	21,0	20,7
2. Kultur	21,6	19,4	16,6	16,0	18,5	20,0	19,2	18,1	18,5	19,8	21,9	19,3
Mittelwert	22,0	19,7	17,95	16,8	18,7	19,75	18,6	18,9	20,05	20,45	21,45	20,0
Standardabw.	0,56	0,42	1,90	1,13	0,28	0,35	0,84	1,13	2,19	0,91	0,63	0,98

Tab. 3: Die Konzentrationen der Kulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden, zeigten sich als konstant ohne Ansteigen oder Abfallen der Werte zu einem bestimmten Mediumwechsel.

TNF – α Konzentrationen (pg/ml) in den Kulturen, in denen Spongostan und MG63 – Zellen ohne Überführung kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	18,6	20,4	19,1	19,5	19,0	21,9	24,6	22,6	22,7	26,9	21,0	28,4
2. Kultur	16,6	19,6	16,7	20,7	20,0	20,6	25,1	21,6	20,8	21,0	20,6	20,4
Mittelwert	17,6	20,0	17,9	20,1	19,5	21,25	24,85	22,1	21,75	23,95	20,8	24,4
Standardabw.	1,41	0,56	1,69	0,84	0,70	0,91	0,35	0,70	1,34	4,17	0,28	5,65

Tab. 4: Bei den Kulturen ohne Überführung des Spongostan – Schwamms zeigt sich zu Beginn ein ähnlicher Verlauf bezogen auf den Anstieg der TNF – α Konzentrationen. Ab dem 7. Mediumwechsel waren allerdings bei diesem Ansatz höhere Werte bis über 28 pg/ml zu messen.

Ergebnisse

TNF – α Konzentrationen (pg/ml) im Medium

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	12,5	12,4	12,7	12,5	13,1	14,8	12,7	13,1	12,2	13,4	13,7	12,0
2. Kultur	12,2	12,7	13,1	11,8	12,4	12,2	13,4	13,1	12,0	12,5	12,6	13,3
Mittelwert	12,35	12,55	12,9	12,15	12,75	13,5	13,05	13,1	12,1	12,95	13,15	12,65
Standardabw.	0,21	0,21	0,28	0,49	0,49	1,83	0,49	0	0,14	0,63	0,77	0,91

Tab. 5: Ohne Zusatz von MG63 – Zellen waren die Werte für TNF – α in der Kontrollkultur mit dem Medium allein über den ganzen Beobachtungszeitraum konstant niedrig zwischen 12 und 13 pg/ml.

TNF – α Konzentrationen (pg/ml) im Medium inklusive eines Spongostan - Schwamms

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	13,5	12,6	12,3	13,2	11,8	12,3	13,1	12,0	12,4	12,2	11,9	14,2
2. Kultur	10,8	12,0	11,8	13,7	14,8	13,6	10,9	14,1	11,9	13,0	13,1	12,0
Mittelwert	12,15	12,3	12,05	13,45	13,3	12,95	12,0	13,05	12,15	12,6	12,5	13,1
Standardabw.	1,90	0,42	0,35	0,35	2,12	0,91	1,55	1,48	0,35	0,56	0,84	1,55

Tab. 6: Gleiches zeigte sich auch bei der Kontrollkultur mit Spongostan. Die TNF – α Konzentrationen zeigten die gleiche Konstanz mit Werten zwischen 12 und 13 pg/ml.

Vergleich der TNF – α Konzentrationen der Kulturen, die auf dem gasdurchlässigen Folienboden kultiviert wurden

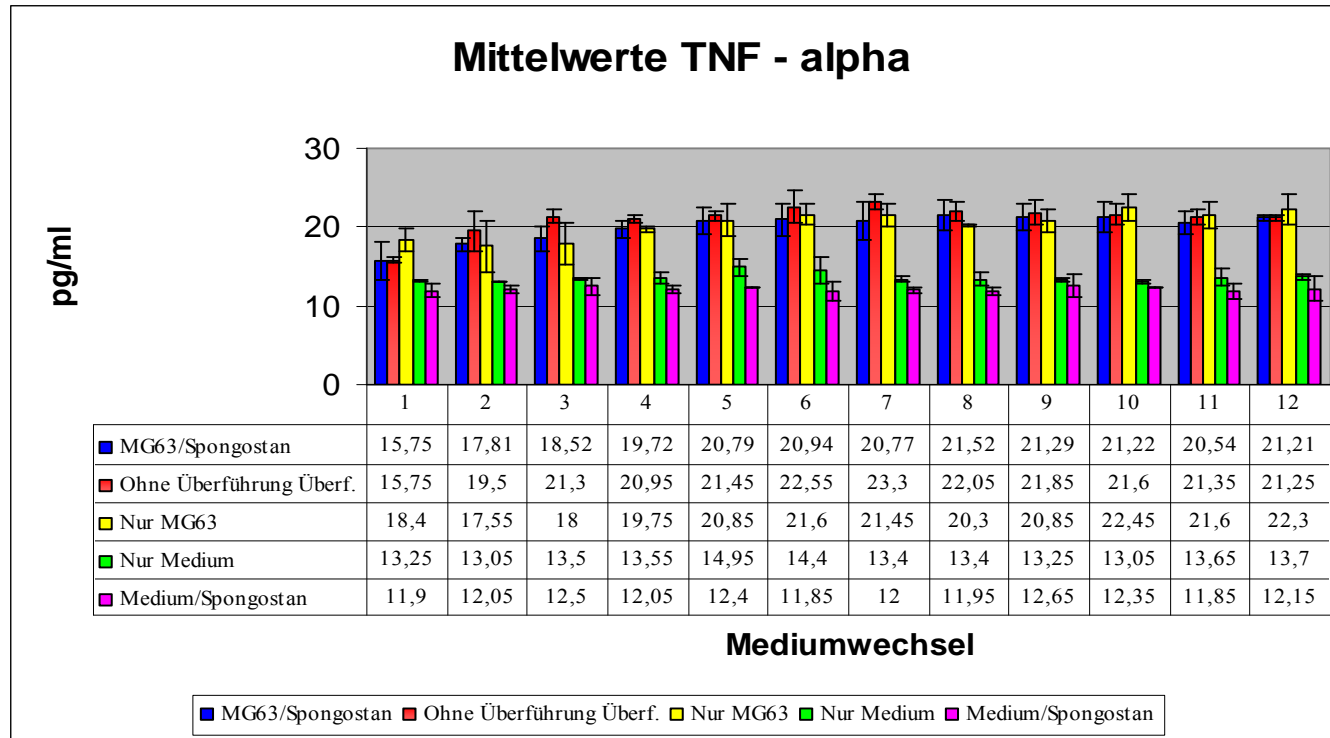


Abb. 9: Mittelwerte der TNF – α Konzentrationen auf gasdurchlässigem Folienboden

Ergebnisse

TNF – α Konzentrationen (pg/ml) bei 700.000 Zellen MG63/Schwamm mit der Lumox dish gasdurchlässigen Kulturschale

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	13,7	17,3	17,4	18,1	21,9	21,3	18,6	20,5	19,6	19,6	18,4	20,8
2. Kultur	14,4	19,9	18,4	20,6	22,6	21,8	21,1	23,1	21,9	23,1	20,3	21,0
3. Kultur	19,0	18,2	18,0	20,6	20,0	20,7	21,6	20,3	23,8	20,4	18,8	21,5
4. Kultur	17,5	17,4	19,9	20,2	21,9	20,8	19,0	21,6	22,4	20,5	20,1	21,1
5. Kultur	13,3	17,4	20,2	18,9	20,7	20,5	22,9	21,3	19,6	21,0	20,6	22,0
6. Kultur	12,8	17,5	16,6	18,3	18,4	16,7	16,8	18,3	18,5	20,3	21,2	21,6
7. Kultur	15,1	17,1	16,5	19,8	17,9	20,6	20,8	21,3	20,9	19,2	20,0	21,0
8. Kultur	20,2	17,7	21,2	21,2	22,9	25,1	25,3	25,8	23,7	25,7	22,5	20,7
9. Kultur	15,3	17,5	18,0	19,4	20,1	20,8	21,0	20,8	20,9	20,0	23,5	21,3
10. Kultur	16,2	18,1	19,0	20,1	21,5	21,1	20,6	22,2	21,6	22,4	21,0	21,1

Mittelwert	15,75	17,81	18,52	19,72	20,79	20,94	20,77	21,52	21,29	21,22	20,54	21,21
Standardabw.	2,47	0,81	1,55	1,02	1,69	2,01	2,34	1,96	1,75	1,97	1,53	0,39

Tab. 7: Die Konzentrationen für TNF – α zeigten bei dem Versuchsaufbau mit der gasdurchlässigen Membran vom 1. Mediumwechsel einen stetigen Anstieg bis zum 6. Wechsel. Nach dem 6. Mediumwechsel waren keine wesentlichen Veränderungen mehr nachzuweisen. Die Werte bleiben zwischen 20 und 22 pg/ml.

Ergebnisse

TNF – α Konzentrationen (pg/ml) in den Kulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	17,4	15,3	16,1	19,5	19,4	22,5	22,5	20,4	19,8	22,7	22,8	23,7
2. Kultur	19,4	19,8	19,9	20,0	22,3	20,7	20,4	20,2	21,9	21,2	20,4	20,9
Mittelwert	18,4	17,55	18,0	19,75	20,85	21,6	21,45	20,3	20,85	21,95	21,6	22,3
Standardabw.	1,41	3,18	2,68	0,35	2,05	1,27	1,48	0,14	1,48	1,06	1,69	1,97

Tab. 8 : Auch in den Kontrollkulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden, konnte wie bei dem Versuch mit auf Spongostan ausgesetzten Zellen ein Anstieg der TNF – α Konzentrationen auf Werte zwischen 20 und 22 pg/ml beobachtet werden, bevor es zu keinen weiteren Anstiegen kam.

TNF – α Konzentrationen (pg/ml) in den Kulturen, in denen Spongostan und MG63 – Zellen ohne Überführung kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	16,0	21,3	21,9	21,3	21,9	24,0	24,0	22,9	23,0	22,5	22,0	21,0
2. Kultur	15,5	17,7	20,7	20,6	21,0	21,1	22,6	21,2	20,7	20,7	20,7	21,5
Mittelwert	15,75	19,5	21,3	20,95	21,45	22,55	23,3	22,05	21,85	21,6	21,35	21,25
Standardabw.	0,35	2,54	0,84	0,49	0,63	2,05	0,98	1,20	1,62	1,27	0,91	0,35

Tab. 9: In den Kulturen, in denen Spongostan und MG63 – Zellen ohne Überführung kultiviert wurden, war ein schnellerer Anstieg der TNF – α Konzentrationen zu beobachten. So erreichten die Werte bereits beim 2. Mediumwechsel Werte über 20 pg/ml und stiegen bis zum 7. Wechsel auf über 23 pg/ml an.

Ergebnisse

TNF – α Konzentrationen (pg/ml) im Medium

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	13,2	13,0	13,6	13,1	15,7	15,6	13,2	14,0	13,4	12,9	14,4	14,0
2. Kultur	13,3	13,1	13,4	14,0	14,2	13,2	13,6	12,8	13,1	13,2	12,9	13,4
Mittelwert	13,25	13,05	13,5	13,55	14,95	14,4	13,4	13,4	13,25	13,05	13,65	13,7
Standardabw.	0,07	0,07	0,14	0,63	1,06	1,69	0,28	0,84	0,21	0,21	1,06	0,42

Tab. 10: Die Konzentrationen von TNF – α im Medium alleine als Negativkontrolle weisen über die Gesamtdauer des Versuches keine signifikanten Unterschiede im Sinne eines Anstiegs oder Abfalls auf und bewegen sich auf gleich niedrigem Niveau.

TNF – α Konzentrationen (pg/ml) im Medium inklusive eines Spongostan – Schwamms

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	11,3	12,4	13,3	11,7	12,4	12,7	11,7	12,3	11,6	12,3	11,2	11,0
2. Kultur	12,5	11,7	11,7	12,4	12,4	11,0	12,3	11,6	13,7	12,4	12,5	13,3
Mittelwert	11,9	12,05	12,5	12,05	12,4	11,85	12,0	11,95	12,65	12,35	11,85	12,15
Standardabw.	0,84	0,49	1,13	0,49	0	1,20	0,42	0,49	1,48	0,07	0,91	1,62

Tab. 11: Auch die Negativkontrolle mit Spongostan, das ohne Zugabe von Zellen im Medium belassen wurde, zeigt konstant niedrige Konzentrationen für

TNF – α .

Zusammenfassung der Ergebnisse der TNF – α Messungen

Bei den beiden Versuchsansätzen mit herkömmlichem Boden zum einen und dem gasdurchlässigen Folienboden zum anderen zeigte sich über den Beobachtungszeitraum ein vergleichbares Bild. Wie in den Grafiken ersichtlich konnten bei beiden Ansätzen ab dem 1. Mediumwechsel ein Anstieg der Konzentrationen beobachtet werden, der sich bis zur Hälfte des Versuchs hinzog bis die Konzentrationen beim Erreichen von Werten zwischen 20 und 22 pg/ml konstant blieben und sich weder ein Anstieg noch ein Abfallen zeigen ließ.

Die Kontrollgruppen zeigten auch unabhängig ihres Versuchsansatzes vergleichbare Werte. So blieben die Konzentrationen für TNF – α sowohl in der Kultur mit reinem Medium als auch in der Kultur mit Medium und Spongostan über den ganzen Zeitraum auf einem konstant niedrigen Niveau und erreichten lediglich Maximalwerte von 13 bis 14 pg/ml.

In den Kulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden, konnten ähnliche Konzentrationen gemessen werden wie in den beiden Versuchsansätzen mit Spongostan. Auch hinsichtlich der Maximalwerte ergaben sich keine deutlichen Unterschiede.

Auch in den Kulturen, in denen der Spongostan – Schwamm zwischen dem Mediumwechsel nicht in ein neues well überführt und über den ganzen Zeitraum über belassen wurde, zeigte sich ein vergleichbares Bild bezüglich eines anfänglichen Anstiegs der Konzentrationen bis zum Erreichen von konstanten Maximalwerten. Diese lagen vereinzelt höher als die der Versuchsansätze.

Die unten angeführte Grafik vergleicht abschließend die TNF – α Konzentrationen der beiden Versuchsansätze.

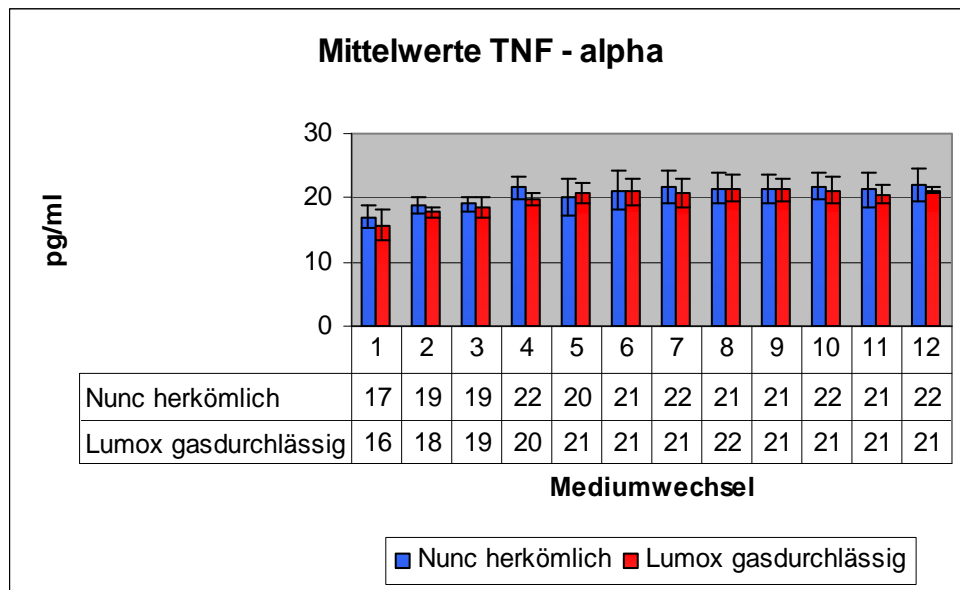


Abb. 10: Mittelwerte der TNF – α Konzentrationen der beiden beobachteten Versuchsansätze im Vergleich.

Sowohl der vergleichbare Anstieg der Konzentrationen zu Beginn des Beobachtungszeitraums als auch das Erreichen eines konstanten Maximums während der Mitte bis zum Abschluss der Versuchsreihe ist deutlich zu erkennen.

Für die statistischen Auswertungen wurde der Mann – Whitney Test im Programm GraphPad Prism aufgrund der nicht vorhandenen Normalverteilung herangezogen. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Versuchsansätzen gefunden werden, bezogen auf den jeweils unterschiedlichen Folienboden.

3.1.2 Interleukin – 8

Vergleich der IL - 8 Konzentrationen der Kulturen, die auf herkömmlichen Schalen ohne gasdurchlässige Membran kultiviert wurden

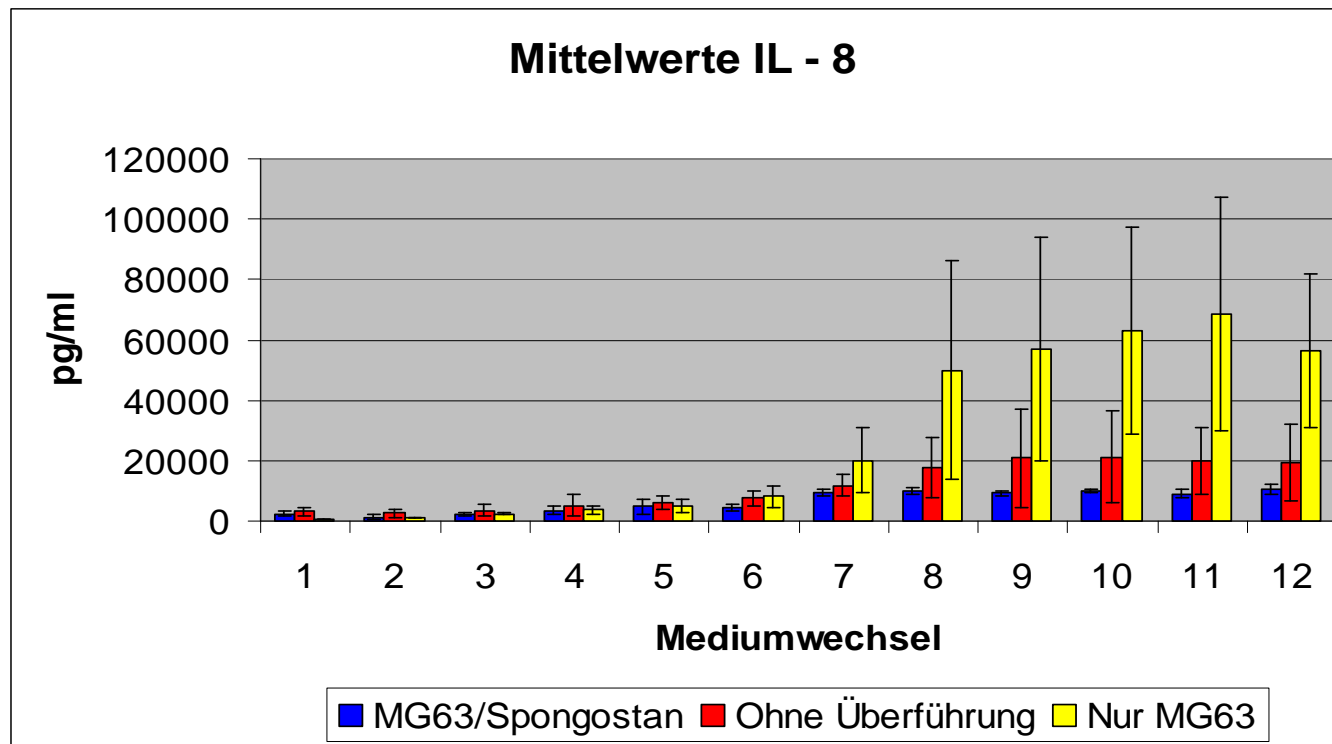


Abb. 11: Mittelwerte der Interleukin – 8 Konzentrationen auf herkömmlichem Folienboden.

IL – 8 Konzentrationen (pg/ml) bei 700.000 Zellen MG63/Schwamm ohne gasdurchlässigen Folienboden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	4100	2620	3500	3820	10200	7080	8900	12820	10420	10560	10140	12000
2. Kultur	3360	1962	2980	6560	7380	5600	8940	11020	9780	10680	7500	11140
3. Kultur	2720	1756	2580	3620	4080	4360	10660	10600	9540	9520	7700	10400
4. Kultur	2680	1534	2000	3140	3980	3720	9360	8720	7720	8480	7000	8240
5. Kultur	1848	898	1578	2500	2820	3300	8060	9060	9360	9810	8080	10440
6. Kultur	2420	1472	2860	4460	5800	5560	11280	9920	9100	10100	11540	13360
7. Kultur	1558	788	1408	2520	3600	3920	9780	8320	8680	9400	8560	8780
8. Kultur	1468	736	1542	2120	3080	3240	8260	10320	9500	10860	9520	9800
9. Kultur	1628	816	1506	2320	2920	3580	9940	10200	9000	10040	9740	10580
10. Kultur	1806	1182	2220	3120	3540	3640	8520	8660	8740	9820	9320	10340

Mittelwert	2358,8	1376,4	2217,4	3418	4740	4400	9370	9964	9184	9927	8910	10508
Standardabw.	869,67	615,04	733,67	1327,73	2390,07	1267,89	1047,84	1359,27	728,45	702,63	1397,24	1469,69

Tab. 12: Die Konzentrationen für Interleukin – 8 zeigten beim Versuchsaufbau mit der herkömmlichen well plate ohne gasdurchlässigen Folienboden bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes einen durchgehenden Anstieg.

IL – 8 Konzentrationen (pg/ml) in den Kulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	644	1236	2760	4800	6580	10780	27560	75460	83260	87200	95780	74440
2. Kultur	578	1054	2100	2820	3480	5620	12420	24560	30920	38680	40980	38540
Mittelwert	611	1145	2430	3810	5030	8200	19990	50010	57090	62940	68380	56490
Standardabw.	46,66	128,69	466,69	1400,07	2192,03	3648,67	10705,6	35991,74	37009,97	34308,82	38749,45	25385,13

Tab. 13: In den Kontrollkulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden, zeigte sich im Vergleich zu dem Versuchsaufbau mit Spongostan bis zum 6.

Mediumwechsel ein vergleichbarer Anstieg der Konzentrationen. Ab dem 7. Mediumwechsel konnten deutlich höhere Werte beobachtet werden.

IL – 8 Konzentrationen (pg/ml) in den Kulturen, in denen Spongostan und MG63 – Zellen ohne Überführung kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	3900	3380	4820	7760	7600	9480	14480	24900	32320	31820	27900	28280
2. Kultur	2200	1672	2020	2720	4520	5960	9220	10660	9240	10460	11900	10480
Mittelwert	3050	2526	3420	5240	6060	7720	11850	17780	20780	21140	19900	19380
Standardabw.	1202,08	1207,73	1979,89	3563,81	2177,88	2489,01	3719,38	10069,20	16320,02	15103,80	11313,70	12586,50

Tab. 14: Bei den Kulturen, bei denen Spongostan nicht bei jedem Mediumwechsel überführt wurde, zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der alleinigen

Kultivierung der MG63 – Zellen. Bis zum 6. Mediumwechsel lagen die Werte auf vergleichbarem Niveau. Vom 7. Wechsel an war wie oben beschrieben ein deutlicher Anstieg zu sehen, der allerdings weniger stark ausfiel.

IL – 8 Konzentrationen (pg/ml) im Medium

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2. Kultur	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Mittelwert	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Standardabw.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 15: Die Expression von Interleukin – 8 konnte in pg/ml konnte in der Kontrollgruppe nicht nachgewiesen werden, wobei 5 pg/ml die untere Nachweisgrenze zur Bestimmung von Interleukin – 8 darstellt

IL – 8 Konzentrationen (pg/ml) im Medium inklusive eines Spongostan – Schwamms

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2. Kultur	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Mittelwert	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Standardabw.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 16: Ebenso wie bei der reinen Kontrollkultur konnte auch bei den Kontrollkulturen, die noch mit Spongostan versetzt waren, keine Expression von Interleukin – 8 über die untere Nachweisgrenze von 5 pg/ml festgestellt werden.

Vergleich Interleukin - 8 Konzentrationen der Kulturen, die auf dem gasdurchlässigen Folienboden kultiviert wurden

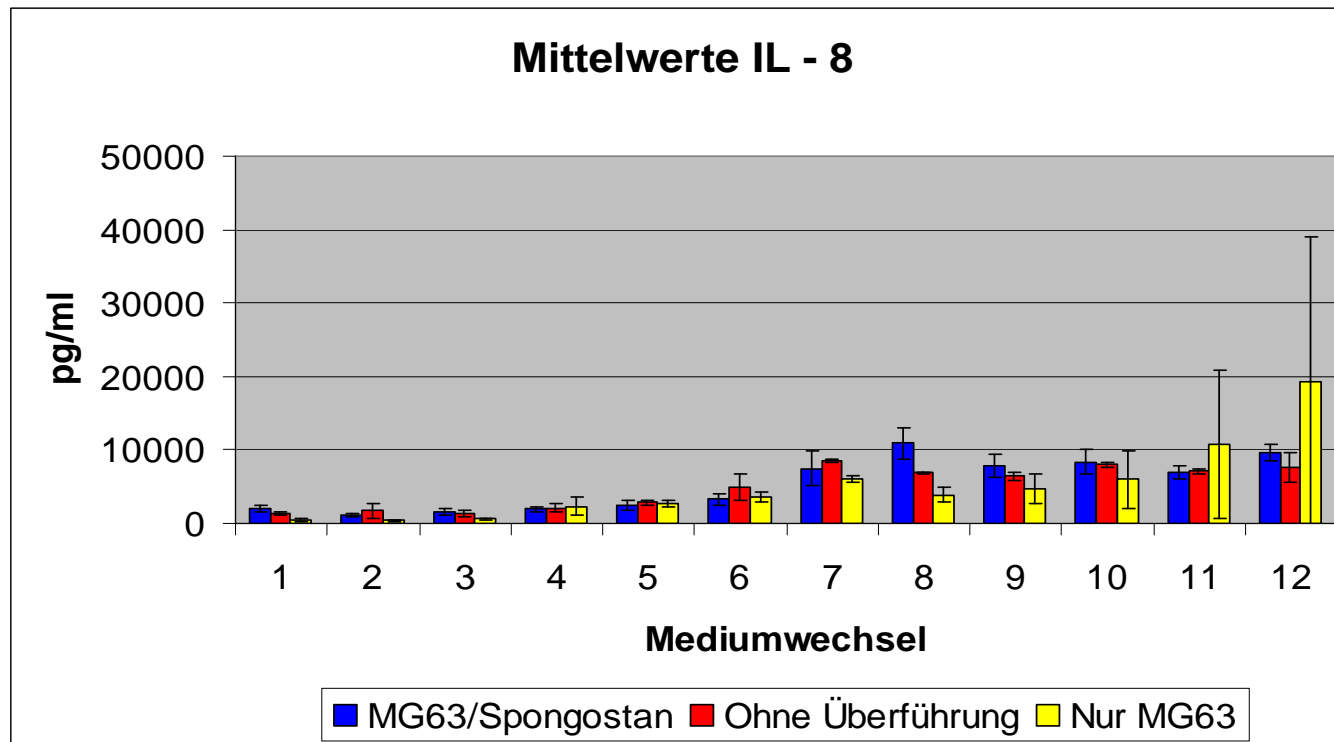


Abb. 12: Mittelwerte der Interleukin – 8 Konzentrationen auf dem gasdurchlässigen Folienboden.

IL - 8 Konzentrationen (pg/ml) bei 700.000 Zellen MG63/Schwamm mit der Lumox dish gasdurchlässigen Kulturschale

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	2265	1185	1920	2045	3625	3415	6700	12800	8550	11150	8250	9650
2. Kultur	1342	810	1788	2080	2160	2760	5880	10900	8720	10100	7700	9000
3. Kultur	3040	1532	1950	1876	3460	2980	6380	8180	5860	7200	6980	10180
4. Kultur	2020	1158	1138	2540	2820	4700	9580	13160	10460	8660	7740	11400
5. Kultur	1644	820	960	1550	2520	3120	5580	12720	6920	6060	5780	8500
6. Kultur	1882	868	1736	1722	2000	2480	6000	7680	6620	5920	5080	11540
7. Kultur	1708	792	892	1396	1476	2380	6400	8360	6080	9340	7020	8440
8. Kultur	2620	1478	2180	2180	2280	4480	13360	13440	9080	8720	7320	8900
9. Kultur	2160	1082	1430	1716	2760	2980	6260	10520	6860	8440	7000	9200
10. Kultur	1966	1078	1710	2140	2320	3600	8700	11280	8720	8360	6960	10220

Mittelwert	2064,7	1080,3	1570,4	1924,5	2542,1	3289,5	7484	10904	7787	8395	6983	9703
Standardabw.	492,20	268,37	443,68	339,22	652,76	781,88	2433,70	2185,52	1518,04	1652,44	935,52	1114,86

Tab. 17: Die Konzentrationen für Interleukin – 8 zeigten bei dem Versuchsaufbau mit der semipermeablen Lumox well plate einen konstanten Anstieg, deren Maximum am 8. Mediumwechsel erreicht war. Im Folgenden fielen die Werte deutlich ab, bevor am letzten Mediumwechsel noch mal ein deutlicher Anstieg zu sehen war.

IL – 8 Konzentrationen (pg/ml) in den Kulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	624	230	502	3180	3020	4080	5720	4560	6060	8720	17820	33240
2. Kultur	304	474	724	1382	2320	3160	6320	3260	3300	3220	3680	5260
Mittelwert	464	352	613	2281	2670	3620	6020	3910	4680	5970	10750	19250
Standardabw.	226,27	172,53	156,97	1271,37	494,97	650,53	424,26	919,23	1951,61	3889,08	9998,48	19784,84

Tab. 18: In den Kontrollkulturen, in denen ausschließlich MG63 – Zellen kultiviert wurden, zeigte sich zu Beginn des Beobachtungszeitraums ein im Vergleich deutlich geringerer Anstieg der Konzentrationen. In einer Kultur ließen sich am 11. und 12. Mediumwechsel allerdings Werte beobachten, die deutlich höher lagen als in den übrigen Kulturen.

IL – 8 Konzentrationen (pg/ml) in den Kulturen, in denen Spongostan und MG63 – Zellen ohne Überführung kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	1164	994	974	1664	2540	6180	8320	7000	6860	7680	6840	6200
2. Kultur	1430	2400	1700	2480	3080	3600	8600	6860	6080	8250	7320	9140
Mittelwert	1297	1697	1337	2072	2810	4890	8460	6930	6470	7965	7080	7670
Standardabw.	188,09	994,19	513,35	576,99	381,83	1824,33	197,98	98,99	551,54	403,05	339,41	2078,89

Tab. 19: Die Konzentrationen für IL – 8 in den Kulturen ohne Überführung des Spongostans zeigten einen dem Versuchsaufbau ähnlichen Verlauf mit Anstieg bis zum 7. Mediumwechsel und wiederum leichten Abfall der Werte. Die Maximalwerte lagen erkennbar unter den Werten aus dem Versuch mit Überführung des Spongostans.

IL – 8 Konzentrationen (pg/ml) im Medium

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2. Kultur	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Mittelwert	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Standardabw.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 20: Die Expression von Interleukin – 8 in konnte in der Kontrollgruppe mit alleinigem Medium nicht nachgewiesen werden, wobei 5 pg/ml die untere Nachweisgrenze zur Bestimmung von Interleukin – 8 darstellt.

IL – 8 Konzentrationen (pg/ml) im Medium inklusive eines Spongostan – Schwamms

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2. Kultur	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Mittelwert	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Standardabw.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 21: Ebenso konnte keine Expression von Interleukin – 8 über die untere Nachweisgrenze hinaus bei den Kontrollkulturen nachgewiesen werden, bei denen Spongostan allein im Medium kultiviert wurde.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Interleukin – 8 Messungen

Die Konzentrationen für Interleukin – 8 zeigten bei beiden Versuchsansätzen einen ähnlichen Verlauf über den kompletten Beobachtungszeitraum. So stiegen die Werte vom 1. Mediumwechsel konstant an. Am Tag des 7. Mediumwechsel konnte jeweils der größte Anstieg beobachtet werden. Mit geringen Abweichungen blieben die Konzentrationen von diesem Zeitpunkt an auf einem vergleichbar hohen Niveau.

Da die Konzentrationen für IL – 8 bei den Kontrollgruppen, in denen nur Medium zum einen und Medium mit Spongostan ohne Zusatz von MG63 – Zellen zum anderen kultiviert wurde, unterhalb der unteren Nachweisgrenze von 5 pg/ml lagen, wurde aus statistischen Gründen auf eine Darstellung in den abgebildeten Grafiken verzichtet.

Bei den Kulturen ohne Überführung des Spongostans bei jedem Mediumwechsel zeigte sich ein unterschiedliches Bild bezüglich des Versuchsaufbaus. In der herkömmlichen Nunc Kulturschale kultiviert lagen die Konzentrationen wie in der Grafik ersichtlich ab dem 8. Mediumwechsel deutlich über denen mit permanenter Überführung. Ein anderes Bild zeigte sich bei den Werten aus der Lumox gasdurchlässigen Kulturschale. Hier war kein signifikanter Unterschied zu erkennen bezüglich des Faktors Überführung.

Bei den Kontrollgruppen, in denen nur MG63 – Zellen ohne Spongostan kultiviert wurden zeigte sich ein ähnliches Bild. Lagen die Werte für IL – 8 bei der herkömmlichen Nunc Kulturschale ab dem 7. Mediumwechsel noch deutlich über den Konzentrationen mit Spongostan, zeigten sich auf der Lumox gasdurchlässigen Schale diese Unterschiede nicht. Die Werte waren teilweise auch kleiner gemessen worden. Der extrem erhöhte Wert am 12. Mediumwechsel beruhte möglicherweise auf einem Messfehler.

Die unten dargestellte Grafik vergleicht die Konzentrationen für Interleukin – 8 zwischen den beiden Versuchsansätzen mit unterschiedlichem Folienboden der Kulturschalen.

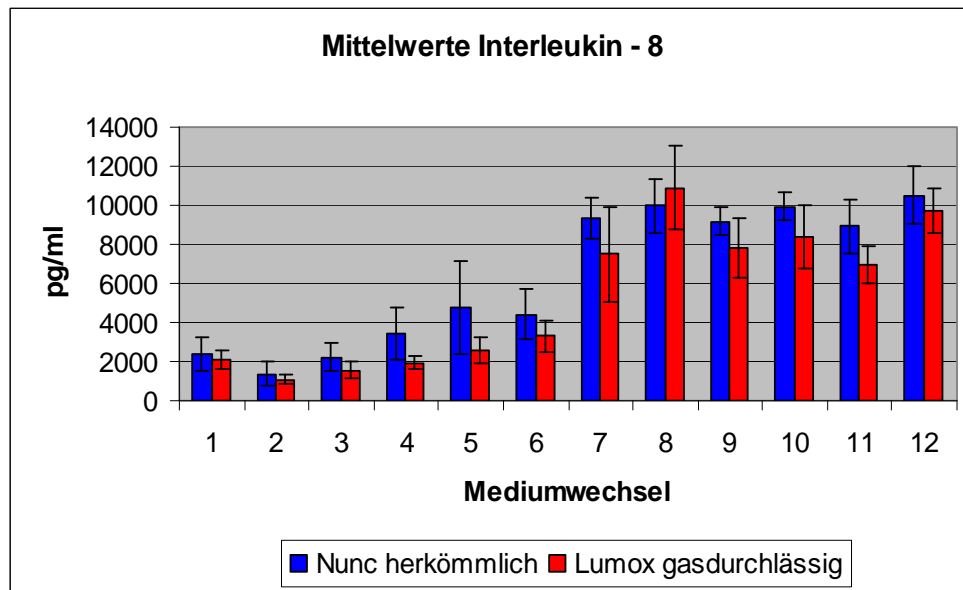


Abb. 13: Mittelwerte der IL – 8 Konzentrationen der beiden beobachteten Versuchsansätze im Vergleich

Bei beiden Versuchsansätzen zeigte sich direkt zu Beginn ein konstanter Anstieg, der am 7. und 8. Mediumwechsel seinen jeweiligen Höhepunkt erreichte. Der Verlauf der Konzentrationen zeigte sich über den gesamten Zeitraum als vergleichbar. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich bezüglich der Maximalwerte. Wie aus der Grafik ersichtlich, lagen die Werte für IL – 8 bei den Kulturen, die auf der Nunc Kulturschale kultiviert wurden, bei den einzelnen Mediumwechseln höher. Ausnahme war der 8. Wechsel. Keine statistisch signifikanten Unterschiede der beiden Versuchsansätze nach Durchführung des Mann – Whitney Test.

3.1.3 Interleukin – 6

Vergleich der IL - 6 Konzentrationen der Kulturen, die auf herkömmlichen Schalen ohne gasdurchlässige Membran kultiviert wurden

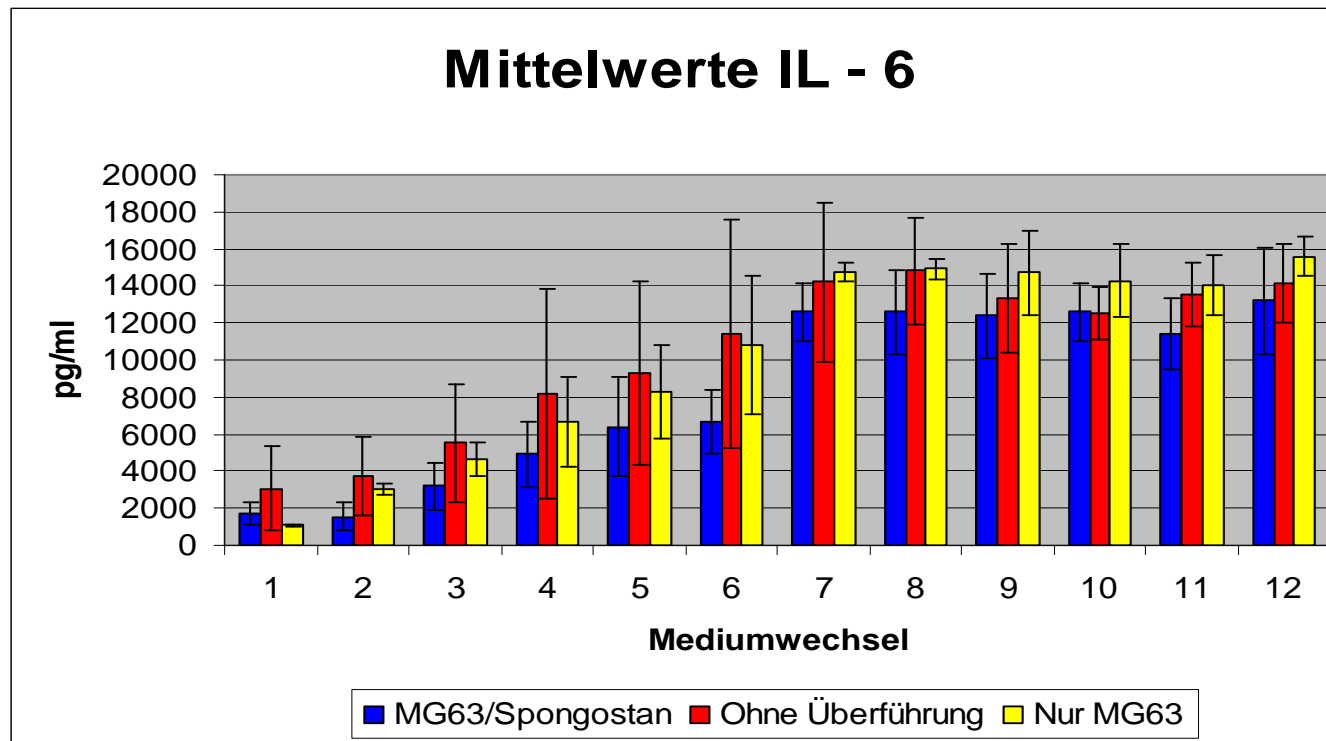


Abb. 14: Mittelwerte der Interleukin – 6 Konzentrationen auf dem herkömmlichen Folienboden.

IL – 6 Konzentrationen (pg/ml) bei 700.000 Zellen MG63/Schwamm ohne gasdurchlässigen Folienboden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	2760	2680	3180	6340	11480	9440	12200	16100	14840	15040	15700	18440
2. Kultur	2580	2680	5560	8360	10240	8660	14520	16520	15540	14900	12620	15920
3. Kultur	1962	1840	3700	5260	5260	6220	11560	11160	10020	10600	8780	10640
4. Kultur	2060	2020	3780	5080	5880	6680	12840	12440	8960	11140	9740	9740
5. Kultur	1206	942	2400	3660	4020	4900	10900	9400	15650	13500	11400	13220
6. Kultur	1768	1858	4900	6640	8300	8800	16040	13620	11720	13780	12720	16820
7. Kultur	1270	934	2360	3840	4960	5920	11920	10540	11740	11540	10700	11440
8. Kultur	1090	792	1966	3180	4760	5080	11040	12400	11920	11640	10160	11700
9. Kultur	938	638	1484	2900	3940	5160	12860	12600	12400	12180	11140	12860
10. Kultur	1388	1144	2560	3940	5040	5560	11920	11160	11280	11740	10980	11440

Mittelwert	1702,2	1552,8	3189	4920	6388	6642	12580	12594	12407	12606	11394	13222
Standardabw.	630,68	765,49	1302,46	1756,63	2667,90	1702,95	1603,16	2293,78	2267,05	1582,48	1932,52	2887,55

Tab. 22: Die Konzentrationen für Interleukin – 6 zeigten im Versuchsaufbau mit dem herkömmlichen undurchlässigen Boden von Beginn an einen stetigen Anstieg. Am Tag des 7. Mediumwechsels war der größte Anstieg zu beobachten. Die Werte blieben bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes auf einem konstant hohen Niveau.

IL – 6 Konzentrationen (pg/ml) in den Kulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	1136	3220	5300	8340	10080	13420	14360	14480	13100	12860	12900	14840
2. Kultur	1038	2800	3980	4940	6540	8160	15080	15320	16320	15640	15220	16360
Mittelwert	1087	3010	4640	6640	8310	10790	14720	14900	14710	14250	14060	15600
Standardabw.	69,29	296,98	933,38	2404,16	2503,15	3719,38	509,11	593,96	2276,88	1965,75	1640,48	1074,80

Tab. 23: Die Kontrollgruppe, in der nur MG63 – Zellen kultiviert wurden, zeigte im Verlauf höhere Werte für Interleukin – 6. Der größte Konzentrationsanstieg war auch hier am Tag des 7. Mediumwechsel zu beobachten.

IL – 6 Konzentrationen (pg/ml) in den Kulturen, in denen Spongostan und MG63 – Zellen ohne Überführung kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	4720	5240	7800	12140	12800	15800	17260	16820	15400	13540	14780	15640
2. Kultur	1440	2200	3280	4140	5820	7080	11140	12800	11240	11540	12360	12660
Mittelwert	3080	3720	5540	8140	9310	11440	14200	14810	13320	12540	13570	14150
Standardabw.	2319,31	2149,60	3196,12	5656,85	4935,60	6165,97	4327,49	2842,56	2941,56	1414,21	1711,19	2107,17

Tab. 24: Ohne Überführung des Spongostans wurden insgesamt deutlich höhere Konzentrationen gemessen.

IL – 6 Konzentrationen (pg/ml) im Medium

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2. Kultur	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Mittelwert	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Standardabw.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 25: Die Expression von Interleukin – 6 konnte in pg/ml konnte in der Kontrollgruppe nicht nachgewiesen werden, wobei 2 pg/ml die untere Nachweisgrenze zur Bestimmung von Interleukin – 6 darstellt

IL – 6 Konzentrationen (pg/ml) im Medium inklusive eines Spongostan – Schwamms

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2. Kultur	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Mittelwert	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Standardabw.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 26: Ebenso wie bei der reinen Kontrollkultur konnte auch bei den Kontrollkulturen, die noch mit einem Stück Spongostan versetzt waren, keine Expression von Interleukin – 6 über die untere Nachweisgrenze von 2 pg/ml festgestellt werden.

Vergleich Interleukin - 6 Konzentrationen der Kulturen, die auf dem gasdurchlässigen Folienboden kultiviert wurden

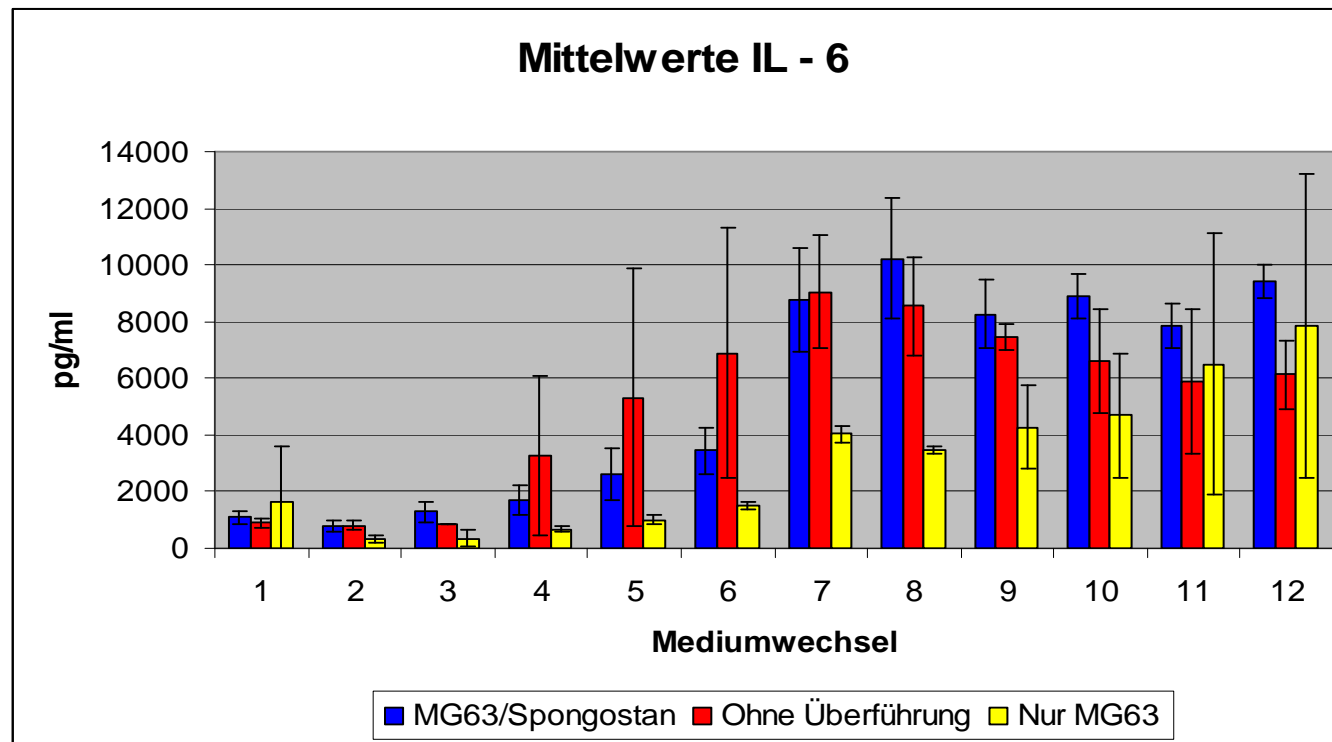


Abb. 15: Mittelwerte der Interleukin – 6 Konzentrationen auf dem gasdurchlässigen Folienboden.

IL - 6 Konzentrationen (pg/ml) bei 700.000 Zellen MG63/Schwamm mit der Lumox dish gasdurchlässigen Kulturschale

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	1185	850	1320	1595	3095	3495	8150	10200	7850	9450	8050	10100
2. Kultur	692	432	974	1198	1670	2540	7100	9900	8120	9120	7920	8580
3. Kultur	1490	1130	2100	2700	4520	4500	10700	10300	8360	9380	7840	10400
4. Kultur	1396	946	1550	2500	3380	2700	8840	9540	8320	8900	8800	9600
5. Kultur	950	744	1150	1674	2940	3340	7800	10580	7360	7840	7280	9220
6. Kultur	928	588	1056	1314	1992	2840	7360	6840	7620	7300	6300	8960
7. Kultur	1050	628	900	1258	1690	3040	7380	9120	7160	9060	7380	8740
8. Kultur	1074	738	1178	1490	1750	5180	13040	15360	11400	10000	9140	9880
9. Kultur	1168	838	1368	1808	3060	3600	8520	10060	7680	8940	7640	9620
10. Kultur	1022	676	1190	1626	2200	3320	9080	10420	8860	8840	8040	9260

Mittelwert	1095,5	757	1278,6	1716,3	2629,7	3455,5	8797	10232	8273	8883	7839	9436
Standardabw.	230,74	196,63	346,12	506,25	931,15	821,88	1830,25	2103,41	1210,38	781,93	791,54	591,55

Tab. 27: Ähnlich den Konzentrationen für Interleukin – 8 zeigten die Konzentrationen für Interleukin – 6 bei dem Versuchsaufbau mit der semipermeablen Lumox well plate einen konstanten Anstieg, deren Maximum am 8. Mediumwechsel erreicht war. Im Folgenden fielen die Werte deutlich ab, bevor am letzten Mediumwechsel noch mal ein deutlicher Anstieg zu sehen war.

IL – 6 Konzentrationen (pg/ml) in den Kulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	3020	228	152	628	878	1440	3820	3580	5320	6220	9760	11640
2. Kultur	240	392	548	738	1136	1626	4240	3360	3240	3140	3220	4080
Mittelwert	1630	310	350	683	1007	1533	4030	3470	4280	4680	6490	7860
Standardabw.	1965,75	115,96	280,01	77,78	182,43	131,52	296,98	155,56	1470,78	2177,88	4624,47	5345,72

Tab. 28: Die Konzentrationen für Interleukin – 6 in der Kontrollkultur, in der nur MG63 – Zellen kultiviert wurden, zeigen insgesamt einen stetigen Anstieg bis zum letzten Mediumwechsel. Insgesamt waren die Werte jedoch deutlich niedriger als im Versuchsaufbau mit Spongostan.

IL – 6 Konzentrationen (pg/ml) in den Kulturen, in denen Spongostan und MG63 – Zellen ohne Überführung kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	776	906	868	1274	2100	3780	7640	7300	7780	7920	7720	6980
2. Kultur	1020	680	860	5260	8520	10000	10460	9780	7120	5290	4090	5260
Mittelwert	898	793	864	3267	5310	6890	9050	8540	7450	6605	5905	6120
Standardabw.	172,53	159,80	5,65	2818,52	4539,62	4398,20	1994,04	1753,62	466,69	1859,69	2566,79	1216,22

Tab. 29: Im Vergleich zum Versuch mit einer ständigen Überführung des Spongostans, zeigten die beiden Kulturen, bei denen keine Überführung stattfand, zu Beginn einen stärkeren Anstieg der Konzentrationen. Insgesamt waren im Verlauf jedoch kleinere Maximalwerte zu beobachten.

IL – 6 Konzentrationen (pg/ml) im Medium

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2. Kultur	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Mittelwert	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Standardabw.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 30: Die Expression von Interleukin – 6 konnte in pg/ml konnte in der Kontrollgruppe nicht nachgewiesen werden, wobei 2 pg/ml die untere Nachweisgrenze zur Bestimmung von Interleukin – 6 darstellt

IL – 6 Konzentrationen (pg/ml) im Medium inklusive eines Spongostan – Schwamms

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2. Kultur	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Mittelwert	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Standardabw.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 31: Ebenso wie bei der reinen Kontrollkultur konnte auch bei den Kontrollkulturen, die noch mit einem Stück Spongostan versetzt waren, keine Expression von Interleukin – 6 über die untere Nachweisgrenze von 2 pg/ml festgestellt werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Interleukin – 6 Messungen

Die Konzentrationen für Interleukin – 6 zeigen bei den Kulturen, die auf den Nunc Zellkulturschalen kultiviert wurden, vom 1. Mediumwechsel an einen stetigen Anstieg der Werte bis zum 7. und 8. Mediumwechsel. Hier erreichten sie ihre maximale Konzentration. Die Werte blieben von diesem Zeitpunkt bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes mit leichten Schwankungen auf einem gleich hohen Niveau. Im Gegensatz zu den Interleukin – 8 Konzentrationen konnten nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturansätzen beobachtet werden. Die höchsten Konzentrationen konnten am ehesten noch in den Gruppen beobachtet werden, in denen der Spongostan® - Schwamm bei den Mediumwechseln nicht überführt wurde. Wie bei den IL – 8 Konzentrationen wurde auf eine graphische Darstellung der Werte aus den Kontrollgruppen, in denen nur Medium und Medium mit Spongostan® ohne Zusatz von MG63 – Zellen kultiviert wurde verzichtet, da diese wie aus den Wertetabellen ersichtlich alle unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

Ein deutlich anderes Bild war bei den Werten der Kulturen zu beobachten, die auf den Lumox Kulturschalen mit gasdurchlässigem Folienboden kultiviert wurden. Hier zeigte sich insbesondere zu Beginn ein deutlich stärkerer Anstieg der Interleukin – 6 Konzentrationen bei den Gruppen ohne Überführung des Spongostans®, der zum Zeitpunkt des 7. Mediumwechsel sein Maximum erreichte und anschließend bis zum 12. Mediumwechsel wiederum abfiel. Bei den Konzentrationen der Kulturen mit permanenter Überführung waren insgesamt die höchsten Werte zu beobachten. Am 7. Mediumwechsel konnte der stärkste Anstieg beobachtet werden. Die Werte der Kontrollgruppen, in denen MG63 – Zellen ohne Spongostan® nur im Medium kultiviert wurden, waren trotz permanentem Anstieg über den ganzen

Beobachtungszeitraum im Vergleich zu den Kulturen mit Spongostan® deutlich geringer gemessen worden.

Abschließend vergleicht die unten dargestellte Grafik die Konzentrationen für Interleukin - 6 zwischen den beiden Versuchsansätzen mit dem jeweils unterschiedlichen Folienboden.

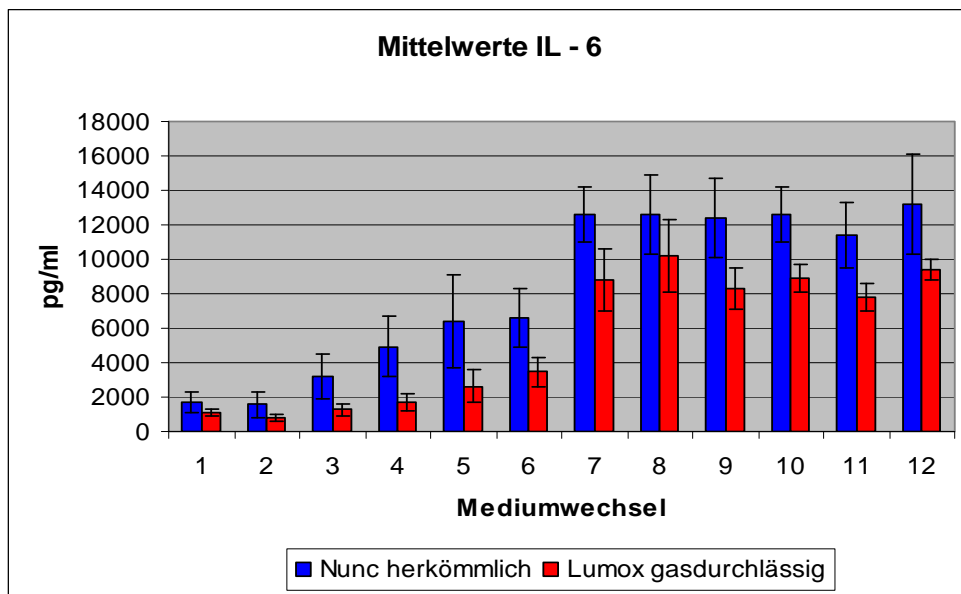


Abb. 16: Mittelwerte der IL – 6 Konzentrationen der beiden beobachteten Versuchsansätze im Vergleich

Wie ersichtlich zeigten sich bei den Interleukin – 6 Konzentrationen größere Unterschiede als bei den IL – 8 Konzentrationen. Der eigentliche Verlauf der Konzentrationen bezüglich des Anstiegs stellte sich als vergleichbar dar. Vom 1. Mediumwechsel an konnte bis zum 7. und 8. Wechsel ein permanenter Anstieg beobachtet werden. Auch fielen die Werte nach dem Erreichen ihres Maximums nicht wesentlich. Deutlich sichtbar waren hingegen die wesentlich höheren Maximalwerte bei den Kulturen mit herkömmlichem Folienboden.

3.2 Laktatausschüttung

Vergleich der Laktat - Konzentrationen der Kulturen, die auf herkömmlichen Schalen ohne gasdurchlässige Membran kultiviert wurden

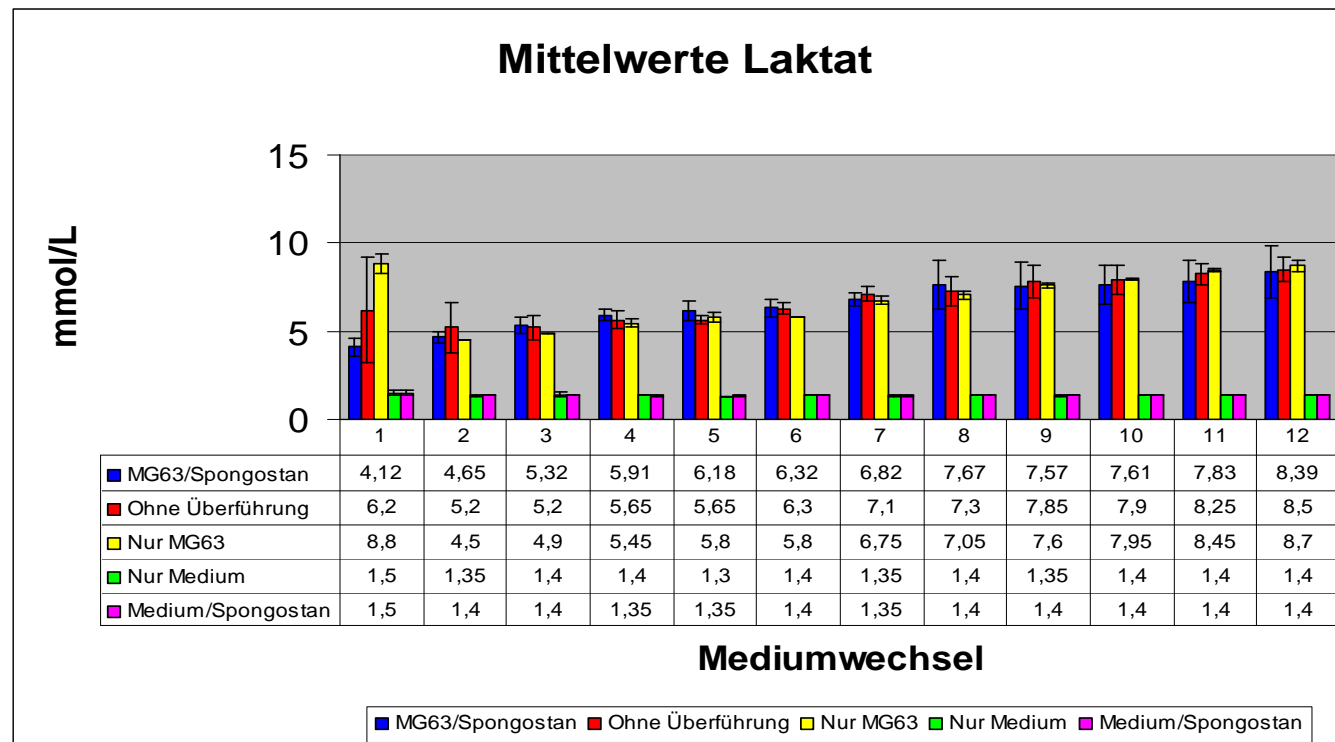


Abb. 17: Mittelwerte der Laktat – Konzentrationen auf dem herkömmlichen Folienboden.

Laktat – Ausschüttung (mmol/L) bei 700.000 Zellen MG63/Schwamm ohne gasdurchlässigen Folienboden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	4,7	5,1	5,8	5,9	7,0	6,8	7,0	7,4	7,7	7,3	7,7	8,4
2. Kultur	5,0	5,1	5,9	6,4	7,1	6,9	7,4	7,3	7,1	7,5	7,7	8,2
3. Kultur	4,3	4,6	5,3	6,1	6,1	6,2	7,3	7,1	7,1	7,5	7,5	8,1
4. Kultur	4,5	4,8	5,8	5,7	5,9	6,9	7,0	7,2	6,9	6,8	7,0	7,6
5. Kultur	3,7	4,6	5,2	6,2	6,3	6,4	6,9	10,6	10,5	10,1	10,6	11,7
6. Kultur	4,3	4,8	5,7	6,4	6,5	6,7	7,0	7,7	7,4	7,7	7,7	8,4
7. Kultur	3,4	4,2	4,6	5,5	5,6	5,7	6,3	6,6	6,4	6,7	6,7	7,2
8. Kultur	3,6	4,3	4,9	5,5	5,6	5,8	6,3	6,4	6,5	6,9	7,0	7,1
9. Kultur	3,8	4,5	5,2	5,8	5,8	5,9	6,5	9,7	9,4	9,0	9,4	10,1
10. Kultur	3,9	4,5	4,8	5,6	5,9	5,9	6,5	6,7	6,7	6,6	7,0	7,1

Mittelwert	4,12	4,65	5,32	5,91	6,18	6,32	6,82	7,67	7,57	7,61	7,83	8,39
Standardabw.	0,52	0,30	0,46	0,34	0,53	0,48	0,39	1,38	1,33	1,11	1,23	1,46

Tab. 32: Die Laktat – Konzentrationen zeigten bis zum letzten Mediumwechsel einen stetigen Anstieg über den ganzen Beobachtungszeitraum.

Laktat – Konzentrationen (mmol/L), in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	9,2	4,5	4,9	5,3	5,6	5,8	6,9	7,2	7,5	7,9	8,5	8,9
2. Kultur	8,4	4,5	4,9	5,6	6,0	5,8	6,6	6,9	7,7	8,0	8,4	8,5
Mittelwert	8,8	4,5	4,9	5,45	5,8	5,8	6,75	7,05	7,6	7,95	8,45	8,7
Standardabw.	0,56	0	0	0,21	0,28	0	0,21	0,21	0,14	0,07	0,07	0,28

Tab. 33: Am 1. Mediumwechsel wurden die höchsten Konzentrationen für Laktat gemessen. Vom 2. Mediumwechsel an lagen die Werte auf gleichem Niveau mit denen aus dem Versuchsaufbau mit Spongostan.

Laktat – Konzentrationen (mmol/L), in denen Spongostan und MG63 – Zellen ohne Überführung kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	8,3	6,2	5,7	6,0	5,8	6,5	7,4	7,9	8,5	8,5	8,7	9,0
2. Kultur	4,1	4,2	4,7	5,3	5,5	6,1	6,8	6,7	7,2	7,3	7,8	8,0
Mittelwert	6,2	5,2	5,2	5,65	5,65	6,3	7,1	7,3	7,85	7,9	8,25	8,5
Standardabw.	2,96	1,41	0,70	0,49	0,21	0,28	0,42	0,84	0,91	0,84	0,63	0,70

Tab. 34: Auch bei den Kulturen ohne Überführung zeigte sich ein vergleichbares Bild. Keine signifikanten Abweichungen zum Versuch mit Überführung des Spongostans oder zur Kontrollkultur mit zellhaltigem Medium.

Laktat – Konzentrationen (mmol/L) im Medium

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	1,6	1,3	1,3	1,4	1,3	1,4	1,3	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
2. Kultur	1,4	1,4	1,5	1,4	1,3	1,4	1,4	1,4	1,3	1,4	1,4	1,4
Mittelwert	1,5	1,35	1,4	1,4	1,3	1,4	1,35	1,4	1,35	1,4	1,4	1,4
Standardabw.	0,14	0,07	0,14	0	0	0	0,07	0	0,07	0	0	0

Tab. 35: Im Medium selbst waren keine erhöhten Konzentrationen für Laktat messbar. Die Werte blieben deutlich niedriger über den ganzen Zeitraum.

Laktat – Konzentrationen (mmol/L) im Medium inklusive Spongostan

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	1,4	1,4	1,4	1,3	1,4	1,4	1,3	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
2. Kultur	1,6	1,4	1,4	1,4	1,3	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Mittelwert	1,5	1,4	1,4	1,35	1,35	1,4	1,35	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Standardabw.	0,14	0	0	0,07	0,07	0	0,07	0	0	0	0	0

Tab. 36: Wie bei der oben angegebenen Konzentration, konnte auch hier keine Erhöhung nachgewiesen werden.

Vergleich der Laktat - Konzentrationen der Kulturen, die auf dem gasdurchlässigen Folienboden kultiviert wurden

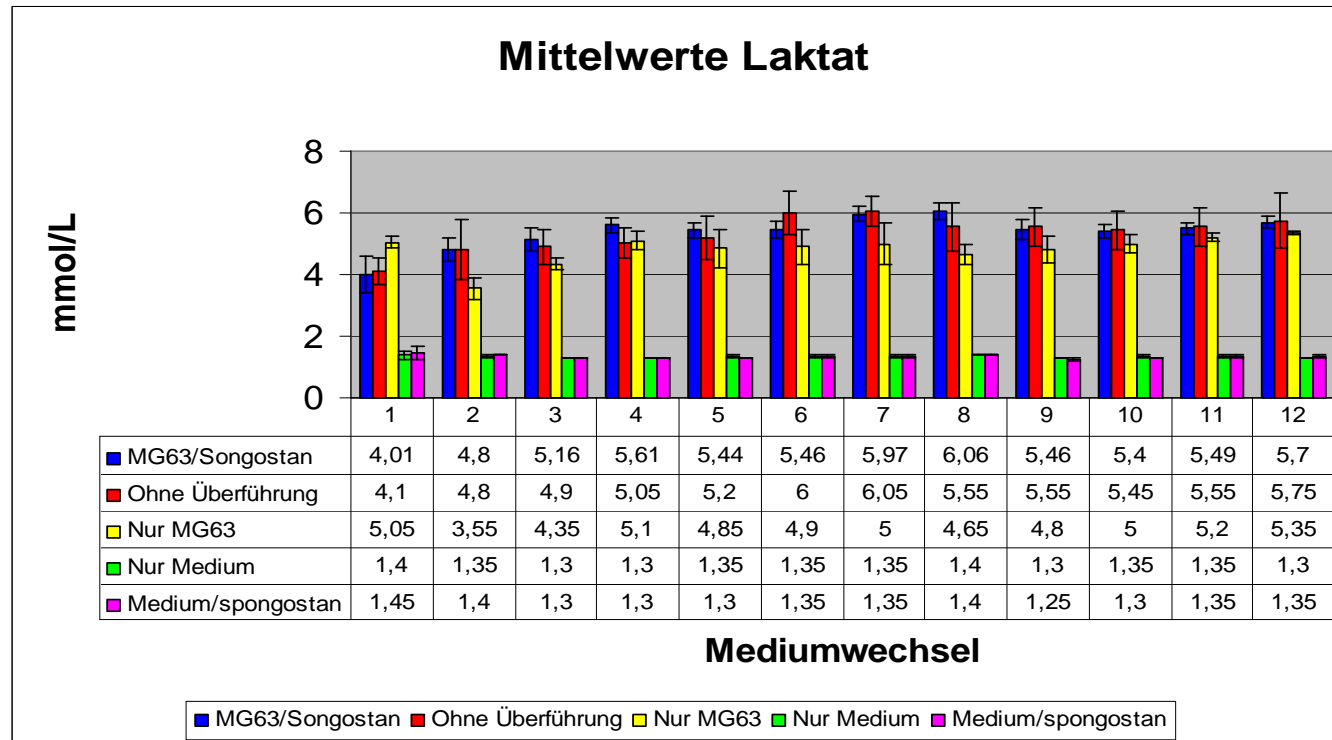


Abb. 18: Mittelwerte der Laktat – Konzentrationen auf dem gasdurchlässigen Folienboden.

Laktat – Konzentrationen (mmol/L) bei 700.000 Zellen MG63/Schwamm mit der Lumox dish gasdurchlässigen Kulturschale

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	4,0	4,8	5,4	5,8	5,8	5,4	5,8	6,3	5,5	5,4	5,4	5,6
2. Kultur	3,7	4,9	5,9	5,9	5,5	5,2	5,7	6,5	5,9	5,4	5,4	5,6
3. Kultur	5,6	5,7	4,8	5,8	5,6	5,7	6,0	6,1	4,6	5,1	5,5	5,4
4. Kultur	3,8	4,4	4,7	5,1	5,0	5,9	6,5	6,1	5,5	5,3	5,7	6,0
5. Kultur	3,5	4,3	4,8	5,4	5,3	5,3	6,0	6,2	5,5	5,2	5,2	5,6
6. Kultur	4,0	4,8	5,6	5,5	5,2	5,4	5,9	5,9	5,7	5,3	5,2	5,8
7. Kultur	3,7	4,7	5,1	5,5	5,4	5,0	5,7	5,9	5,4	5,8	5,7	5,7
8. Kultur	3,8	4,8	5,0	5,9	5,7	5,7	6,1	5,5	5,5	5,7	5,8	5,9
9. Kultur	4,2	4,9	5,0	5,6	5,5	5,4	5,9	6,1	5,3	5,4	5,5	5,6
10. Kultur	3,8	4,7	5,3	5,6	5,4	5,6	6,1	6,0	5,7	5,4	5,5	5,8

Mittelwert	4,01	4,8	5,16	5,61	5,44	5,46	5,97	6,06	5,46	5,4	5,49	5,7
Standardabw.	0,59	0,37	0,38	0,25	0,23	0,26	0,23	0,26	0,34	0,21	0,20	0,17

Tab. 37: Die Konzentrationen stiegen bis zum 7. und 8. Mediumwechsel auf ihre Maximalwerte an. Im weiteren Verlauf war kein Anstieg mehr zu sehen.

Laktat – Konzentrationen (mmol/L), in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	4,9	3,3	4,5	4,9	4,4	4,5	4,5	4,4	4,5	4,8	5,1	5,3
2. Kultur	5,2	3,8	4,2	5,3	5,3	5,3	5,5	4,9	5,1	5,2	5,3	5,4
Mittelwert	5,05	3,55	4,35	5,1	4,85	4,9	5,0	4,65	4,8	5,0	5,2	5,35
Standardabw.	0,21	0,35	0,21	0,28	0,63	0,56	0,70	0,35	0,42	0,28	0,14	0,07

Tab. 38: In den zellhaltigen Kontrollkulturen waren keine signifikanten Abweichungen zu messen.

Laktat – Konzentrationen (mmol/L), in denen Spongostan und MG63 – Zellen ohne Überführung kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	3,8	4,1	4,5	4,7	4,7	5,5	5,7	5,0	5,1	5,0	5,1	5,1
2. Kultur	4,4	5,5	5,3	5,4	5,7	6,5	6,4	6,1	6,0	5,9	6,0	6,4
Mittelwert	4,1	4,8	4,9	5,05	5,2	6,0	6,05	5,55	5,55	5,45	5,55	5,75
Standardabw.	0,42	0,98	0,56	0,49	0,70	0,70	0,49	0,77	0,63	0,63	0,63	0,91

Tab. 39: In den Kulturen ohne Überführung wurde bis zum 7. Mediumwechsel ein geringer Anstieg der Laktat – Konzentrationen gemessen.

Laktat – Konzentrationen (mmol/L) im Medium

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	1,5	1,3	1,3	1,3	1,4	1,3	1,3	1,4	1,3	1,4	1,3	1,3
2. Kultur	1,3	1,4	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3	1,4	1,3
Mittelwert	1,4	1,35	1,3	1,3	1,35	1,35	1,35	1,4	1,3	1,35	1,35	1,3
Standardabw.	0,14	0,07	0	0	0,07	0,07	0,07	0	0	0,07	0,07	0

Tab. 40: Im Medium selbst waren keine erhöhten Konzentrationen für Laktat messbar. Die Werte blieben deutlich niedriger über den ganzen Zeitraum.

Laktat – Konzentrationen (mmol/L) im Medium inklusive eines Spongostan – Schwamms

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	1,3	1,4	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,4	1,3	1,3	1,3	1,4
2. Kultur	1,6	1,4	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4	1,4	1,2	1,3	1,4	1,3
Mittelwert	1,45	1,4	1,3	1,3	1,3	1,35	1,35	1,4	1,25	1,3	1,35	1,35
Standardabw.	0,21	0	0	0	0	0,07	0,07	0	0,07	0	0,07	0,07

Tab. 41: Wie bei der oben angegebenen Konzentration, konnte auch hier keine Erhöhung nachgewiesen werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Laktat – Messungen

Insgesamt zeigten sich bei den Laktat – Bestimmungen bei allen Konzentrationen unabhängig ihres Versuchsaufbaus bezüglich der Kulturschale niedrige Werte. Die niedrigsten Werte wurden sowohl bei der Nunc Kulturschale mit herkömmlichem Boden als auch bei der Lumox well plate mit gasdurchlässigem Boden bei den beiden Kontrollgruppen mit alleinigem Medium und mit Medium inklusive Spongostan gemessen. Wie auch aus den Grafiken ersichtlich kam es bei diesen Kulturen zu keinen Veränderungen.

Die unten aufgeführte Grafik vergleicht die Beiden Versuchsansätze mit den verschiedenen Kulturböden.

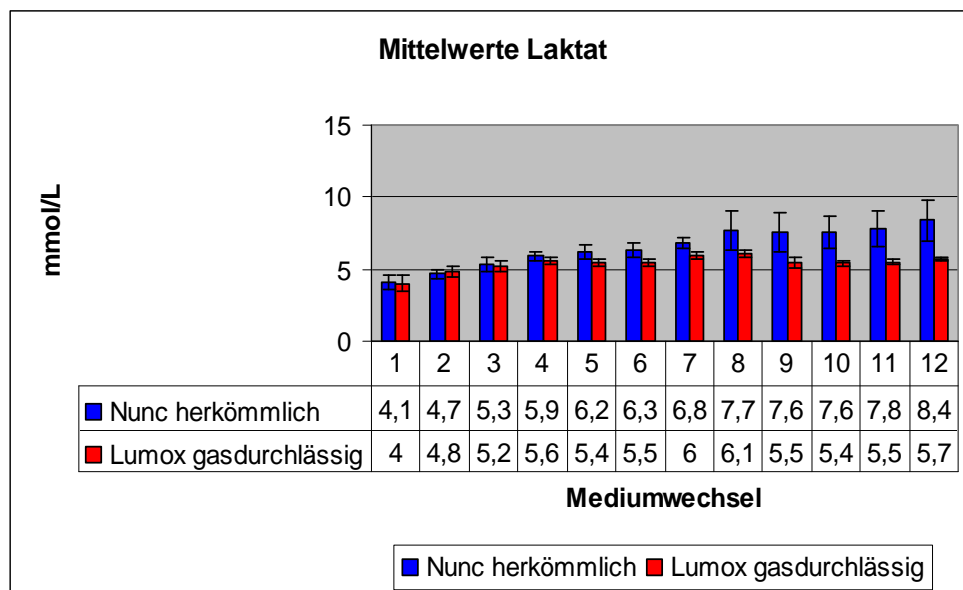


Abb. 19: Mittelwerte der Laktat - Konzentrationen der beiden beobachteten Versuchsansätze im Vergleich

Die Konzentrationen für Laktat stiegen auf der herkömmlichen Nunc Kulturschale über den kompletten Zeitraum in geringem Maße bis zum letzten Mediumwechsel an. Aus der Grafik wird ersichtlich, dass die Laktat – Konzentrationen, die auf der gasdurchlässigen Lumox Schale gemessen wurden, nach anfänglich gleichem Anstieg sistieren und deutlich niedriger bleiben.

3.3 Laktatdehydrogenase, Osteocalcin, Calcium

Die statistischen Auswertungen erfolgten wie beschrieben mit dem Programm GraphPad Prism. Bei den Werten für Osteocalcin zeigten sich im durchgeführten t – Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsansätzen mit verschiedenem Folienboden der jeweiligen Kulturschalen. Auch zu den Werten, die allein im Medium gemessen wurden zeigte sich keine Signifikanz. Die Konzentrationen der Probengruppe waren vergleichbar mit denen der Medium – Kontrollgruppe. Auch bei den Werten für Calcium lagen die Werte der Versuchsansätze auf gleichem Niveau mit denen der Medium – Kulturen. Bei den statistischen Analysen der Laktatdehydrogenase zeigte sich bei erhöhten Werten bei den auf Lumox kultivierten Zellen eine Signifikanz gegenüber der herkömmlichen Kulturschale, die es zu diskutieren galt. Auf detaillierte graphische Darstellungen wurde verzichtet. Die einzelnen Wertetabellen wurden dem Anhang beigelegt.

3.4 Histologie und Einwachsverhalten

Nach Ablauf des Beobachtungszeitraums von 3 Wochen wurden von einigen der Spongostan® - Schwämme wie beschrieben Paraffinschnitte erstellt und mit Hämatoxylin – Eosin gefärbt (HE – Färbung). Dies erlaubte einen besseren Kontrast

zwischen den kultivierten Zellen und dem umliegenden Gelatine – Gerüst des Spongostans®.

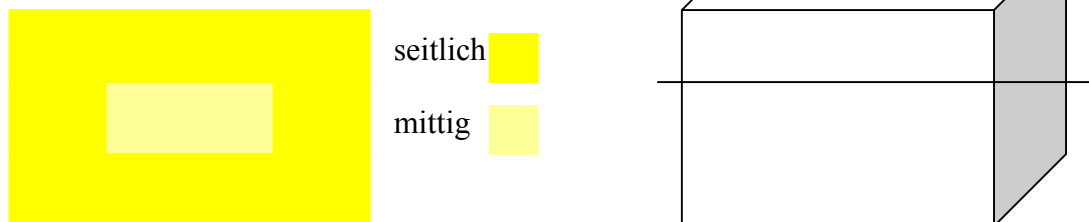
Um einen aussagekräftigen Überblick über das Einwachsverhalten der Zellen in die jeweiligen Schwämme zu bekommen, wurden einige Paraffinblöcke vertikal, andere Blöcke horizontal geschnitten. So war es möglich das Einwachsen der Zellen in verschiedenen Ebenen zu beobachten.

Die anschließende exemplarische Darstellung soll das Prinzip der Schnittführung und der daraus resultierenden histologischen Schnitte erläutern. Durch die in den Bildern angefügte farbliche Markierung lässt sich auf die Lokalisation des histologischen Ausschnitts im jeweiligen Spongostan® - Schwamm schließen.

Vertikalschnitt:



Horizontalschnitt:



Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen aus den Zellkulturen, die auf Lumox dish Zellkulturschalen mit gasdurchlässiger Membran kultiviert wurden:

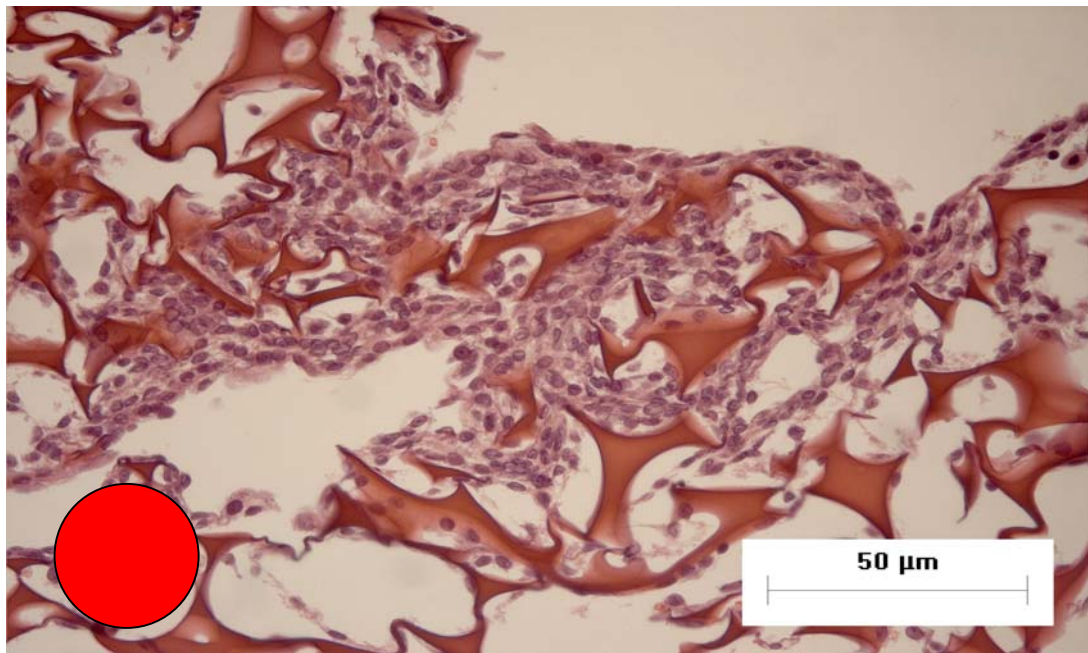


Abb. 20: 200 fache Vergrößerung der Oberfläche eines Spongostan® - Schwamms mit deutlich erkennbaren mehrschichtigen Zellverbänden.

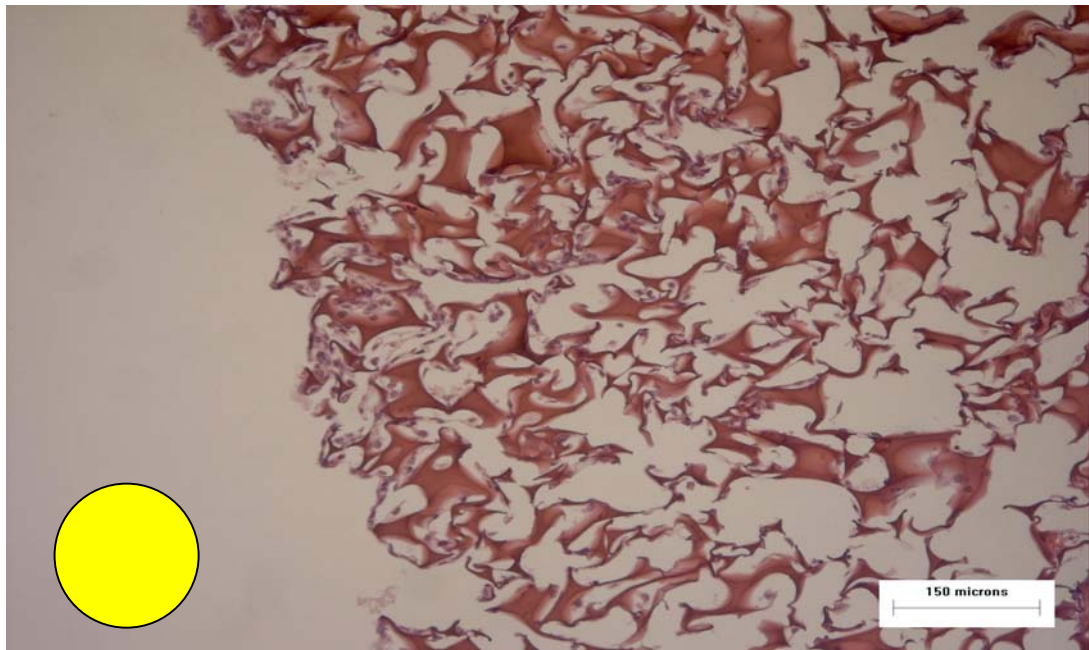


Abb. 21: Übersichtsaufnahme der Seitenränder bei 100 facher Vergrößerung mit zentral einwachsenden Zellverbänden ohne Mehrschichtigkeit.

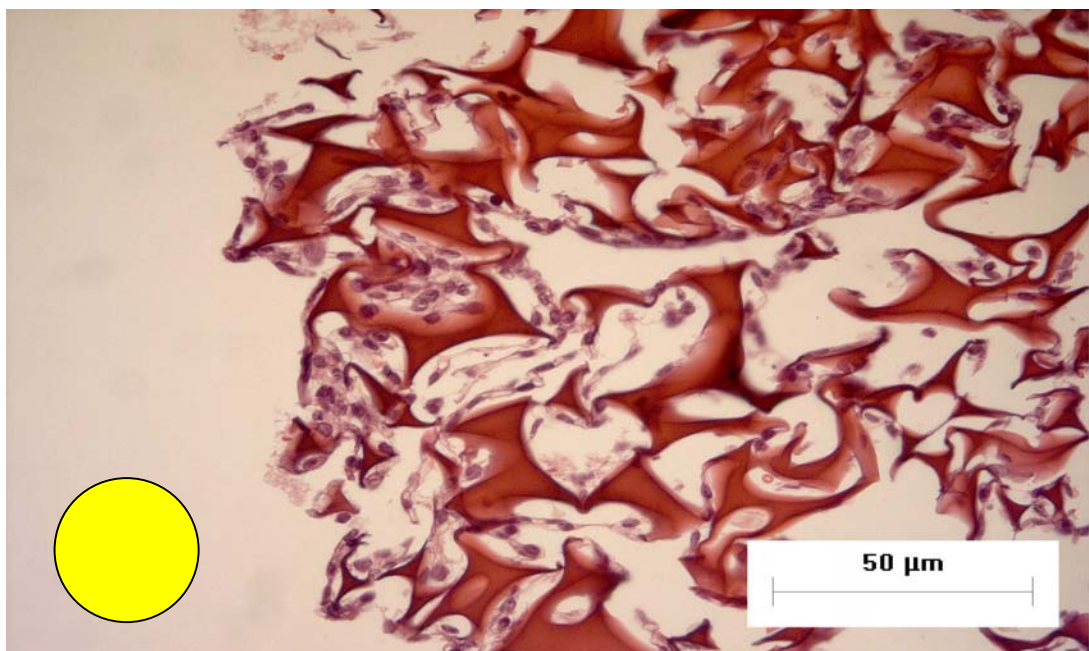


Abb. 22: Seitenränder eines Spongostan® - Schwamms in 200 facher Vergrößerung.

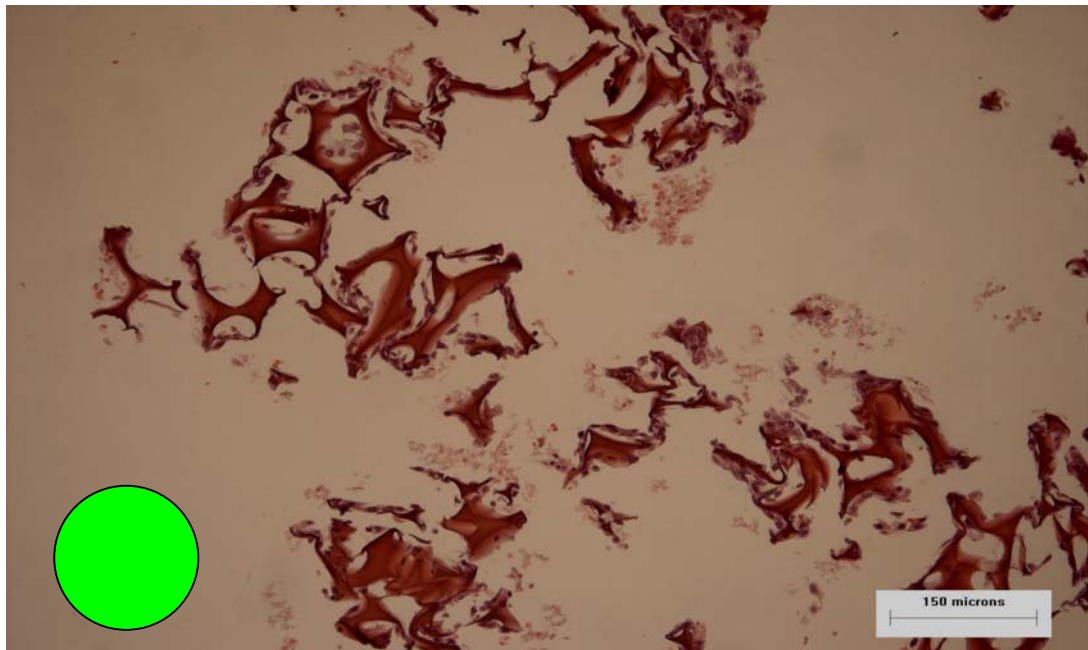


Abb. 23: Darstellung des unteren Teils eines Schwamms in 100 facher Vergrößerung, der dem gasdurchlässigen Folienboden aufliegt. Deutliches Zellwachstum mit erkennbar wenigen Konglomeraten.

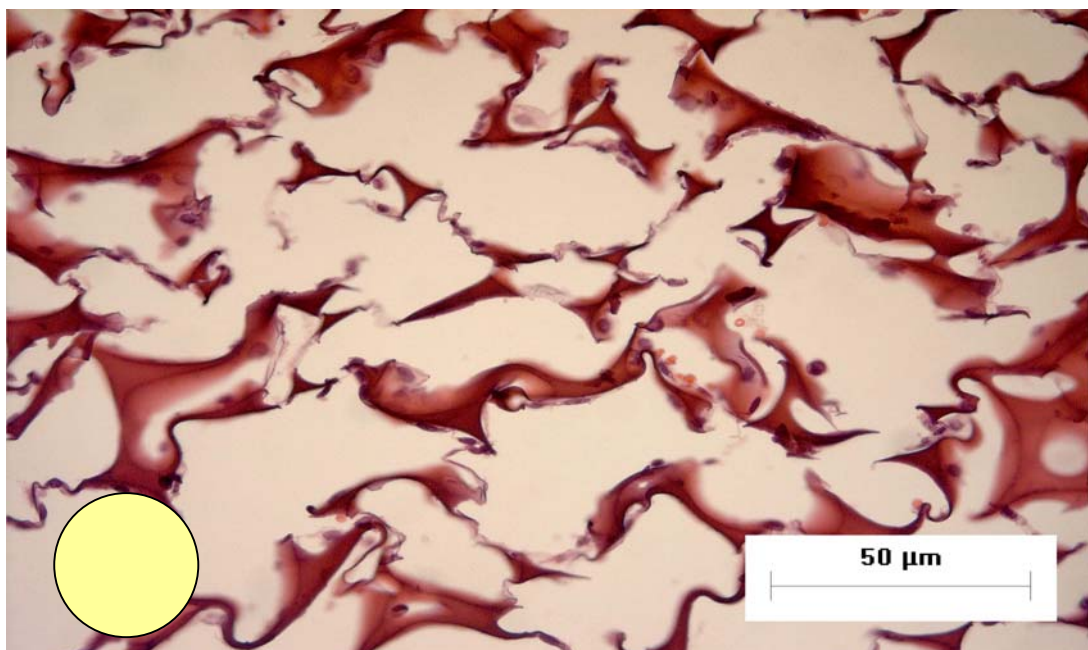


Abb. 24: In der Mitte des Schwamms lediglich sporadisch vorkommende Zellen.

Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen aus den Zellkulturen, die auf den Zellkulturschalen mit herkömmlichem Folienboden kultiviert wurden:

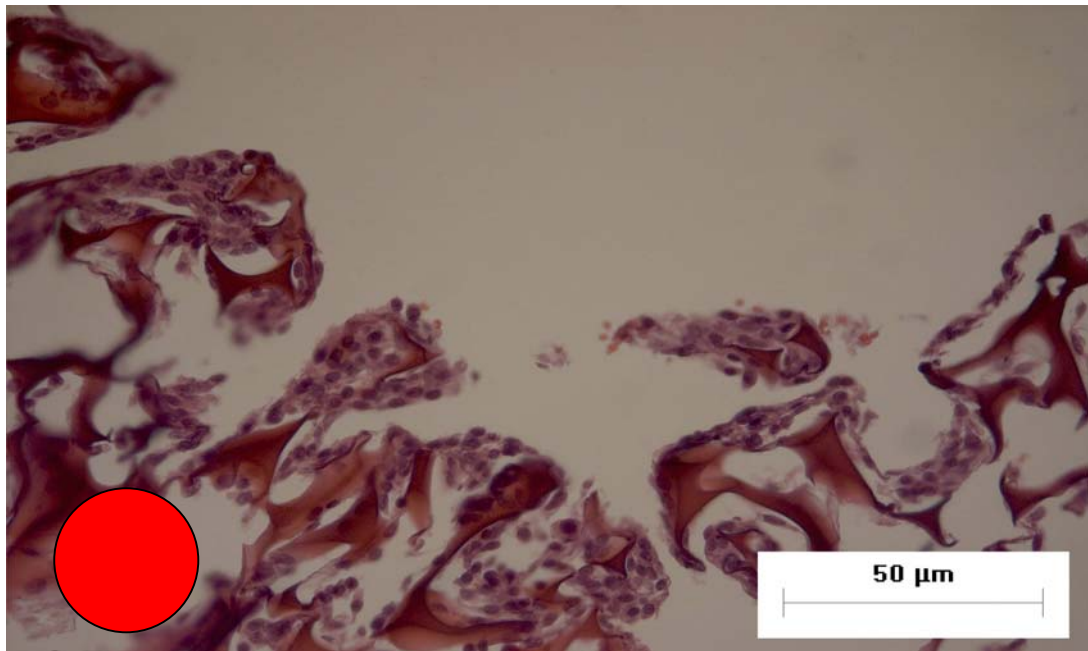


Abb. 25: Darstellung der Oberfläche eines Spongostan® - Schwamms in 200 facher Vergrößerung mit Ausbildung von mehrschichtigen Zellverbänden.

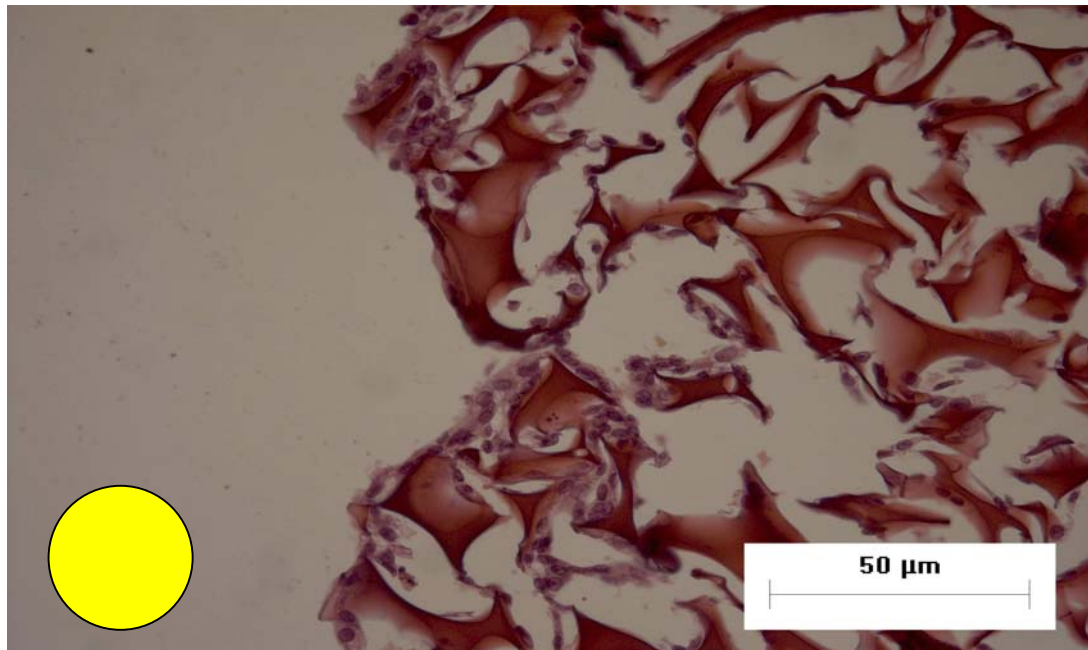


Abb. 26: Seitenränder eines Schwamms in 200 facher Vergrößerung mit teilweise gut ausgebildeten Zellverbänden.

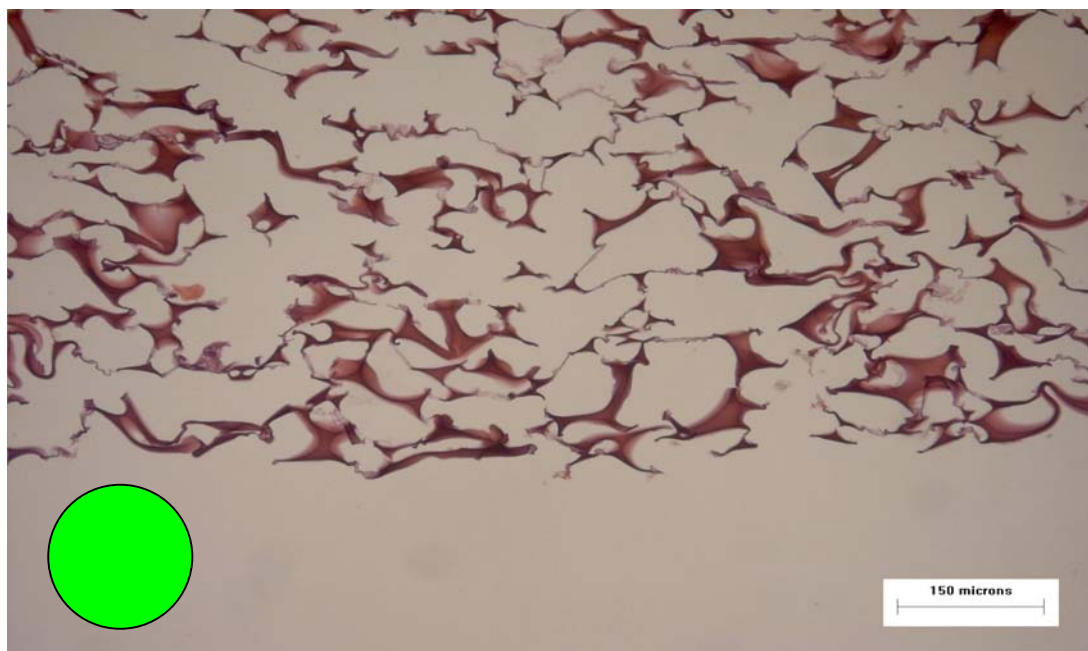


Abb. 27: Im unteren Bereich des Schwamms keine Zellproliferation erkennbar. Darstellung bei 100 facher Vergrößerung.

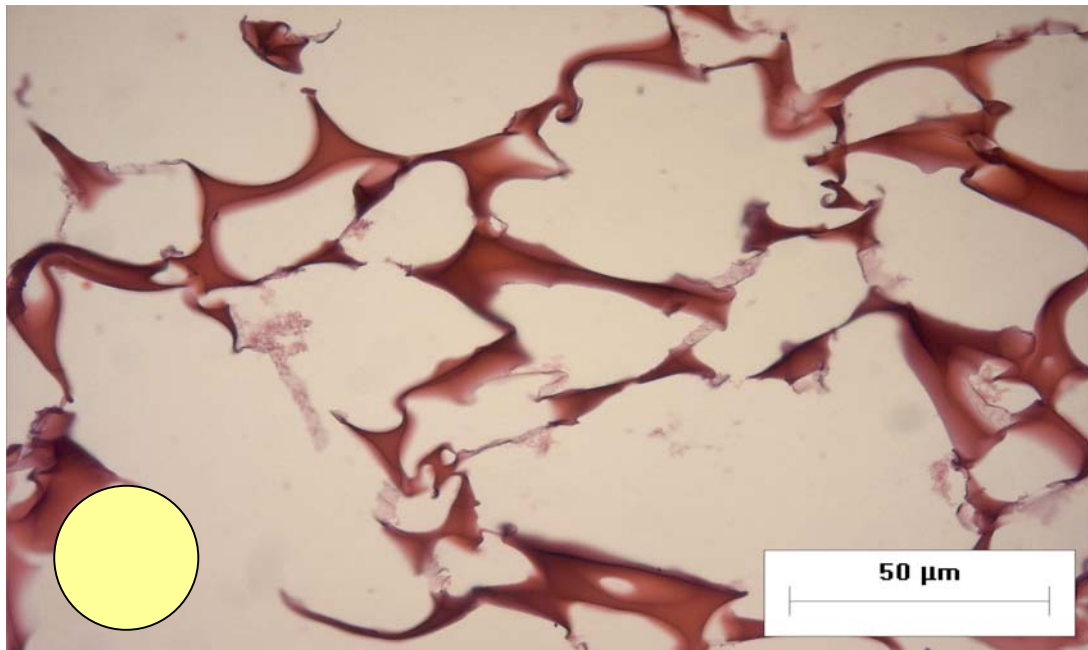
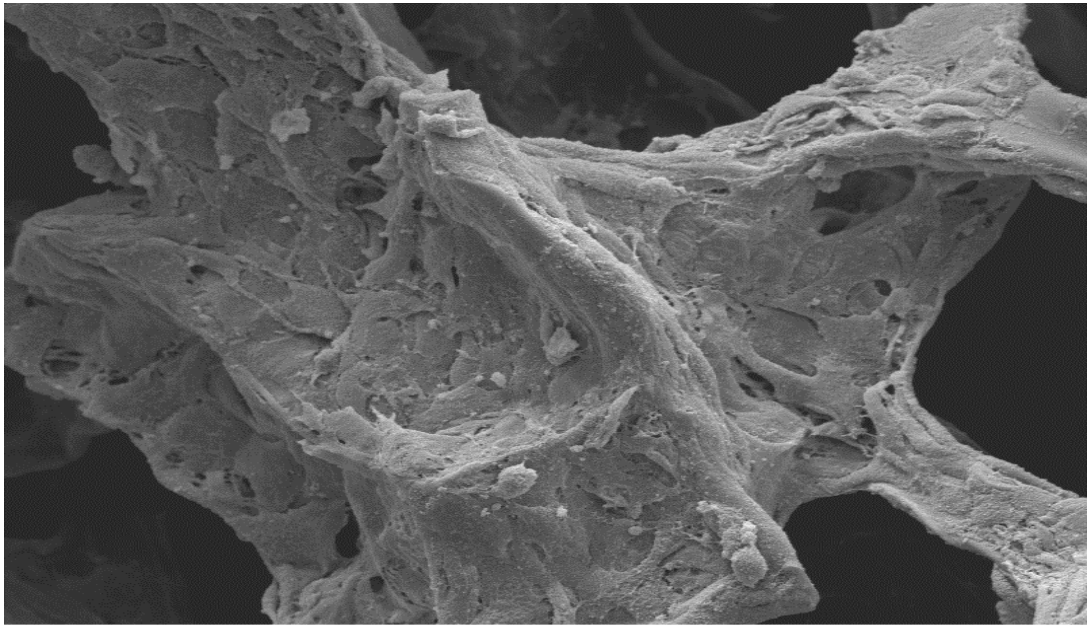


Abb. 28: 200 fache Vergrößerung des mittleren Teils eines Schwamms. Auch in diesem Teil des Spongostan® - Schwamms keine Zellproliferation zu erkennen.

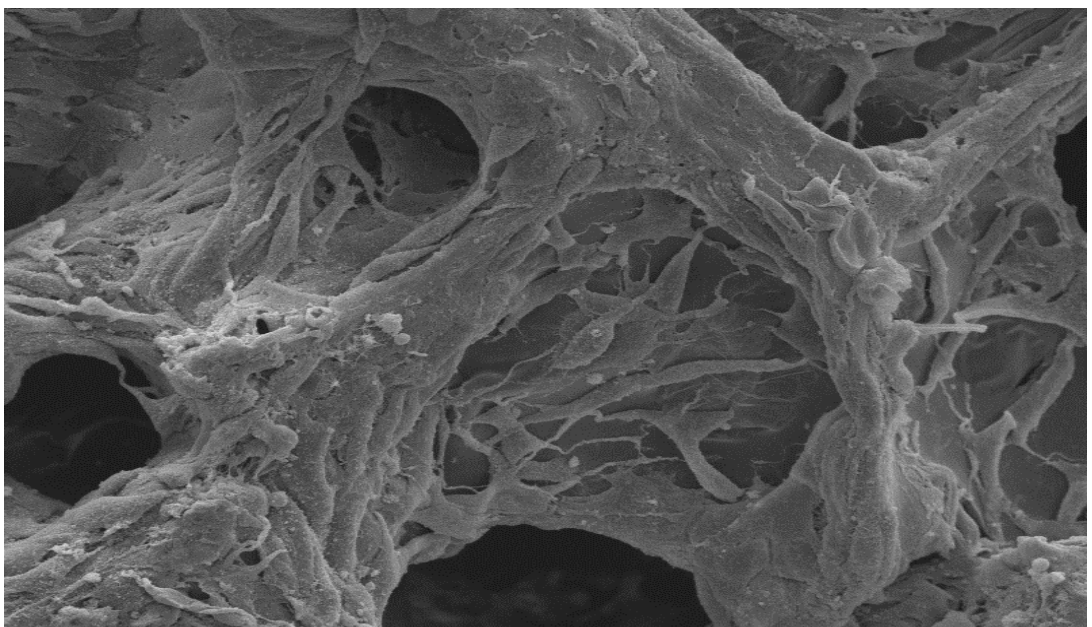
Die folgenden rasterelektronenmikroskopischen Bilder zeigen exemplarisch verschiedene Stellen der jeweiligen Spongostan® - Schwämme. Auf eine eigene Markierung wurde bei diesen Bildern verzichtet. Die Lokalisation ist jedem Bild in der Legende beigegefügt.



MG63 - Spongostan - A2 außen

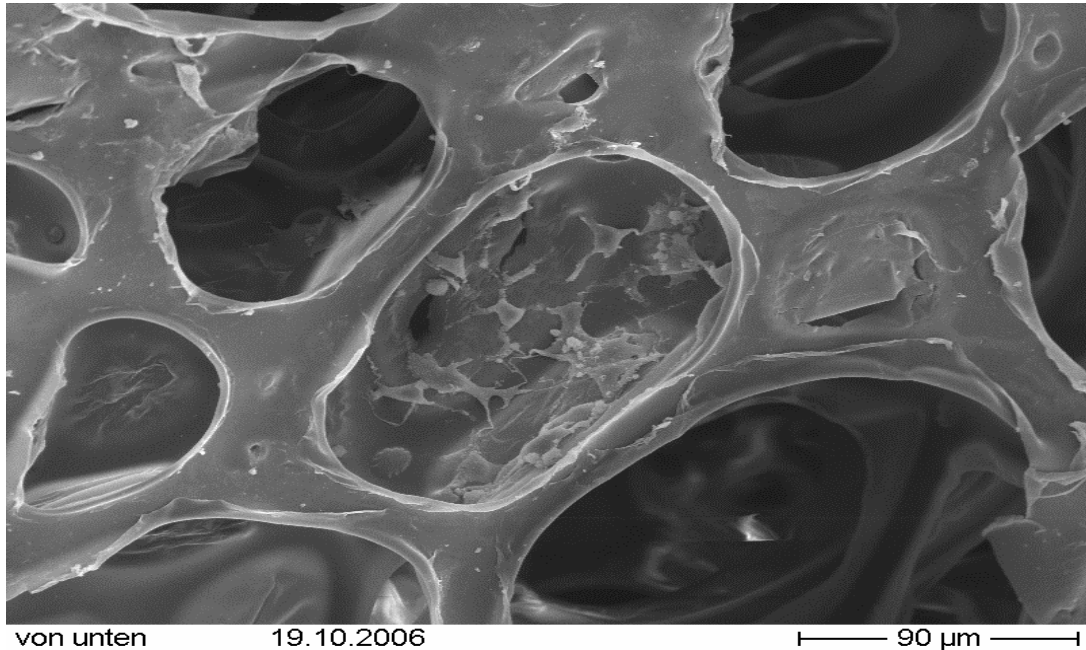
23.10.2006

60 µm



seitlich 19.10.2006

60 µm



3.5 MTT – Test

Die Ergebnisse des MTT – Test werden im Anschluss detailliert in Tabellen und Graphiken dargestellt. Der Test wurde nach beschriebener Vorgehensweise auch mit dem kommerziell zu erwerbenden Knochenzement Cortoss durchgeführt. Somit war es möglich die Wirkung und den Einfluss von Spongostan® auf die Proliferation der Zellen im Vergleich zu einem anderen Knochenersatzstoff zu beurteilen. Dabei wurde Cortoss als Substanz zufällig herangezogen und ausschließlich für den Proliferationsassay benutzt. Von weiteren Vergleichen zwischen Spongostan® und Cortoss wurde allein wegen ihrer unterschiedlichen Struktur und Zusammensetzung verzichtet

Platte 1 – MTT (200µl)

Reihe 1 (A-H): 5000 Zellen pro well, normales RPMI Medium

Reihe 2 (A-H): 5000 Zellen pro well, normales RPMI Medium

Reihe 3 (A-H) 5000 Zellen pro well, verbrauchtes Medium 24 Std., Spongostan

Reihe 4 (A-H): 5000 Zellen pro well, verbrauchtes Medium 24 Std., Spongostan

Reihe 5 (A-H): 5000 Zellen pro well, verbrauchtes Medium 48 Std., Spongostan

Reihe 6 (A-H) 5000 Zellen pro well, verbrauchtes Medium 48 Std., Spongostan

Reihe 7 (A-H): 5000 Zellen pro well, verbrauchtes Medium 72 Std., Spongostan

Reihe 8 (A-H): 5000 Zellen pro well, verbrauchtes Medium 72 Std., Spongostan

Reihe 9 (A-H): 5000 Zellen pro well, verbrauchtes Medium 96 Std., Spongostan

Reihe 10 (A-H): 5000 Zellen pro well, verbrauchtes Medium 96 Std., Spongostan

Reihe 11 (A-H): 5000 Zellen pro well, normales RPMI Medium

Reihe 12 (A-H): 5000 Zellen pro well, normales RPMI Medium

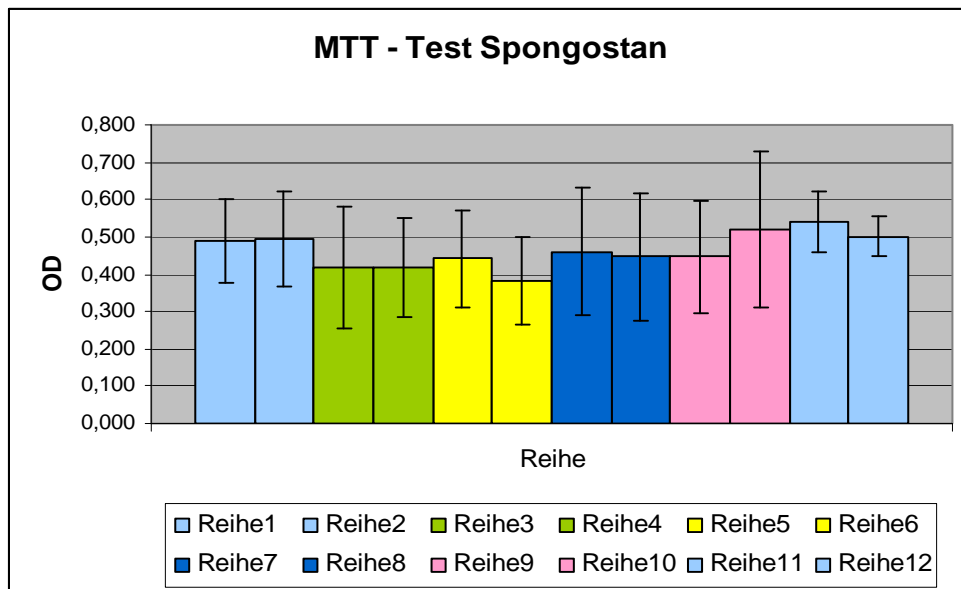


Abb. 29: Graphische Darstellung des MTT – Tests mit Spongostan.

Platte 1 – Spongostan (Wellenlänge 550 nm, Referenzwellenlänge 620 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,327	0,638	0,629	0,485	0,458	0,423	0,411	0,464	0,562	0,607	0,619	0,480
B	0,442	0,626	0,552	0,589	0,611	0,469	0,615	0,626	0,575	0,576	0,487	0,531
C	0,464	0,448	0,184	0,166	0,282	0,281	0,250	0,254	0,192	0,173	0,437	0,536
D	0,413	0,446	0,276	0,338	0,336	0,303	0,366	0,352	0,432	0,457	0,447	0,404
E	0,562	0,324	0,442	0,392	0,475	0,403	0,668	0,590	0,484	0,814	0,589	0,483
F	0,560	0,409	0,274	0,482	0,281	0,201	0,296	0,202	0,251	0,270	0,605	0,562
G	0,691	0,402	0,402	0,376	0,591	0,572	0,680	0,664	0,614	0,633	0,511	0,570
H	0,444	0,657	0,584	0,518	0,490	0,422	0,402	0,421	0,450	0,634	0,641	0,489
MW	0,488	0,494	0,418	0,418	0,441	0,384	0,461	0,447	0,446	0,521	0,542	0,501
Stab.	0,112	0,128	0,163	0,131	0,129	0,117	0,170	0,172	0,152	0,210	0,081	0,054

Tab. 43: Absorptionswerte des MTT – Tests mit Spongostan.

Platte 2 – MTT (200µl)

Reihe 1 (A-H): 5000Zellen pro well, normales RPMI Medium

Reihe 2 (A-H): 5000Zellen pro well, normales RPMI Medium

Reihe 3 (A-H): 5000Zellen pro well, verbrauchtes Medium 24 Std., Cortoss

Reihe 4 (A-H): 5000Zellen pro well, verbrauchtes Medium 24 Std., Cortoss

Reihe 5 (A-H): 5000Zellen pro well, verbrauchtes Medium 48 Std., Cortoss

Reihe 6 (A-H): 5000Zellen pro well, verbrauchtes Medium 48 Std., Cortoss

Reihe 7 (A-H): 5000Zellen pro well, verbrauchtes Medium 72 Std., Cortoss

Reihe 8 (A-H): 5000Zellen pro well, verbrauchtes Medium 72 Std., Cortoss

Reihe 9 (A-H): 5000Zellen pro well, verbrauchtes Medium 96 Std., Cortoss

Reihe 10 (A-H): 5000Zellen pro well, verbrauchtes Medium 96 Std., Cortoss

Reihe 11 (A-H): 5000Zellen pro well, verbrauchtes Medium 120 Std., Cortoss

Reihe 12 (A-H): 5000Zellen pro well, verbrauchtes Medium 120 Std., Cortoss

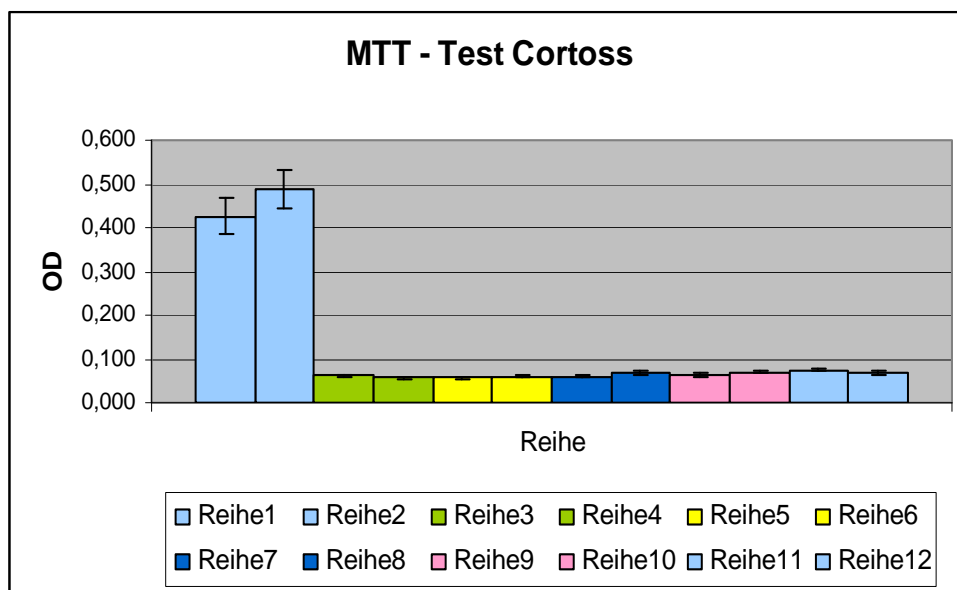


Abb. 30: Graphische Darstellung des MTT – Tests mit Cortoss.

Platte 2 – Cortoss (Wellenlänge 550 nm, Referenzwellenlänge 620 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,393	0,405	0,067	0,060	0,055	0,057	0,058	0,066	0,059	0,065	0,073	0,067
B	0,349	0,462	0,067	0,059	0,056	0,059	0,059	0,066	0,062	0,070	0,077	0,067
C	0,404	0,474	0,061	0,057	0,057	0,059	0,059	0,065	0,061	0,068	0,072	0,065
D	0,454	0,542	0,060	0,056	0,056	0,059	0,059	0,068	0,062	0,070	0,073	0,070
E	0,458	0,523	0,059	0,057	0,061	0,063	0,065	0,073	0,070	0,077	0,080	0,075
F	0,459	0,523	0,059	0,056	0,058	0,061	0,061	0,070	0,069	0,075	0,078	0,076
G	0,428	0,482	0,057	0,056	0,055	0,059	0,059	0,067	0,065	0,069	0,075	0,069
H	0,460	0,507	0,058	0,059	0,060	0,062	0,060	0,070	0,066	0,069	0,072	0,070
MW	0,425	0,489	0,061	0,057	0,057	0,059	0,060	0,068	0,064	0,070	0,075	0,069
Stab.	0,041	0,044	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,004	0,004	0,003	0,004

Tab. 44: Absorptionswerte des MTT – Tests mit Cortoss.

IV. Diskussion

4.1 Spongostan als Trägersubstanz

Als Alternative für den autologen Knochenersatz sind die Anforderungen an eine geeignete Trägersubstanz vielfältig. Diesem Anspruch muss sich Spongostan® als in dieser Studie gewähltem Material stellen. Spongostan® besitzt bezüglich der kommerziellen Verfügbarkeit bei geringen Kosten, der einfachen Anwendung im klinischen Gebrauch und der nicht vorhandenen Fremdreaktion bei Patienten gute Voraussetzungen als geeignete Trägersubstanz [Paganelli 2006].

Neben diesen Voraussetzungen spielt auch die Biokompatibilität und die Osteoinduktion eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die klinische Anwendung am Patienten. In den hier untersuchten Zellkulturen zeigte sich nach Ablauf des Beobachtungszeitraums eine deutliche Abnahme der Größe der verwendeten Gelatine – Schwämme. So schrumpften die einzelnen Schwämme von ihrer ursprünglichen Größe von 10 x 10 x 7 mm auf ungefähr die Hälfte zusammen. Als Erklärung ist sowohl ein permanenter Abbau des Gelatine – Gerüsts denkbar als auch ein in sich zusammenfallendes Gerüsts durch die Aufnahme des verwendeten Mediums. Paganelli et al konnten dies in einer Studie mit Spongostan® als Trägersubstanz für Stammzellen bestätigen. Hierbei war nach 45 Tagen ein deutlicher Größenverlust zu sehen [Paganelli 2006]. In einer tierexperimentellen Studie mit Ratten wurde die vollständige Resorption von Spongostan® nach zwei Wochen beschrieben [Riegels – Nielsen 1986].

Peterson et al demonstrierten die Möglichkeit, Spongostan® zur Defektauffüllung kleinerer Knochendefekte aufgrund von aneurysmatischen Knochenzysten, knorpeligen Exostosen und Osteoidosteom bei Kindern zu nutzen. Nach 3 Monaten wurde die Heilung sowohl klinisch als auch radiologisch belegt [Peterson 1988].

Bezüglich der spontanen Kalzifikation konnten in unserer Studie keine Erkenntnisse gewonnen werden. In einer tierexperimentellen Studie an Ratten, in der Spongostan® als Trägersubstanz für bone morphogenetic proteins (BMP) verwendet wurde, konnten Kos et al minimale kapsuläre zusammenhängende Gewebsformationen um das Gelatine Gerüst feststellen. Nach 8 Wochen zeigte sich zudem eine Hyalinization sowie spärliche Chondroblasten um das Implantat [Kos 2003].

Paganelli et al beschrieben ebenfalls Auftreten von dünnem fibrösem Gewebe um das Spongostan® nach einer Zeit von 45 Tagen. Dabei diene Spongostan® hier als Trägersubstanz für aus Stammzellen differenzierten Osteoblasten [Paganelli 2006].

Eine Fremdkörperreaktion wird von Paganelli et al nicht beschrieben. Auch in anderen Studien werden höchstens minimale Immunantworten oder lymphozytäre Infiltrationen beschrieben. In diesem Fall untersuchten Ponticiello et al Gelfoam, einen ebenfalls auf Gelatine basierenden Schwamm, in Hinblick auf die Biokompatibilität [Ponticiello 2000]. Diese Faktoren erlauben die Annahme, dass Spongostan® selbst und auf Gelatine – Basis produzierte Trägersubstanzen über eine hohe Biokompatibilität verfügen und als Ersatzmaterialien zur Auffüllung von kleineren Knochendefekten geeignet sind.

Der Vergleich des hier untersuchten Zellkulturmodells mit Spongostan® als Trägergerüst für die osteoblast like cell Linie MG63 mit übrigen Studien muss allerdings differenziert betrachtet werden. Die Verwendung von MG-63 Zellen und die daraus resultierenden Ergebnisse des histologischen Einwachsverhaltens in dieser Studie sind vor dem Hintergrund des transformierten Phänotyps der Zellen zu sehen. Im Gegensatz zu primären Zellkulturmodellen besitzen die transformierten MG-63 Zellen ein ungehemmtes Zellwachstum, welches durch die Bildung von dreidimensionalen Verbänden, sog. Multilayer, charakterisiert ist. Primäre Zellkulturen würden ohne die Schaffung von bestimmten Bedingungen in der Zellkultur, z.B. die Zugabe von TGF- β -1 oder BMP, bei vergleichbarem Studienaufbau nicht in der gleichen Art und Weise wachsen, wie sie im folgenden Kapitel beschrieben wird. Nach Ausbildung eines einschichtigen Zellrasens würden

die Zellen durch Kontaktinhibition ihre Teilungsfähigkeit einstellen. Bei den transformierten Zellen findet die 1975 von Abercrombie und Dunn beschriebene Kontaktinhibition nicht mehr statt, so dass sich die Merkmale der Fortbewegung von Zellen in einer Kultur verändern.

Auf der anderen Seite ließ sich durch die unkontrollierte Teilungsfähigkeit der MG63-Zellen das dreidimensionale Einwachsverhalten in die Spongostan®-Schwämme histologisch anschaulich darstellen, was das primäre Interesse dieser Studie darstellte. Einen Übertrag auf primäre Zellkulturmodelle sowohl in vitro als auch in vivo dürfen die Ergebnisse dieser Studie letztendlich nicht liefern.

Ein weiterer Vorteil dieses Zellkulturmodells liegt auf der anderen Seite in dem hohen Maß an Standardisierbarkeit. Dieses Maß wird vor allem durch den Gebrauch des kommerziell erhältlichen Spongostans® und der definierten Zellreihe MG63 unter den vorgegebenen Bedingungen des Versuchsaufbaus erreicht. Damit sind die Standardisierbarkeit sowie die Reproduzierbarkeit in gleichem Maß gegeben.

4.2 Histologie und Einwachsverhalten

Insgesamt zeigte sich in allen angefertigten und lichtmikroskopisch untersuchten Paraffinschnitten ein ähnliches dreidimensionales Einwachsverhalten. Dieses war zunächst einmal unabhängig von der jeweils verwendeten Zellkulturschale hinsichtlich der Beschaffenheit des Folienbodens. Die histologischen Ergebnisse werden hier anhand der Lichtmikroskopie diskutiert, konnten jedoch in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt werden, so dass sich die Ergebnisse auch auf die Elektronenmikroskopie beziehen lassen.

Die größte Zelldichte konnte bei beiden Versuchsansätzen jeweils an der Oberfläche des Spongostan® - Schwamms festgestellt werden. Wie in den Abbildungen 20 und 25 ersichtlich, bildeten sich an der Oberfläche stellenweise dichte teils

mehrschichtige Zellverbände aus. Diese zeigten zudem ein Einwachsverhalten, welches infiltrierend ins Innere des Schwamms ausgerichtet war. Ebenso konnte an den seitlich gelegenen Rändern der Spongostan® - Schwämme (Abb. 22 und 26) noch eine gute Zellproliferation festgestellt werden. Hier waren sowohl die mehrschichtigen zusammenhängenden Zellverbände als auch das Einwachsen in die Tiefe insgesamt deutlich weniger ausgeprägt.

Der größte Unterschied zwischen den Spongostan® - Schwämmen, die auf Zellkulturschalen mit herkömmlichem Boden und denen, die auf den Lumox dish Kulturschalen mit gasdurchlässigem Folienboden kultiviert wurden, zeigte sich in der Histologie in unteren und mittleren Bereichen der Schwämme. Die untere Seite des Schwamms, also der Teil, der dem Folienboden direkt auflag, zeigte bei den Schwämmen der herkömmlichen Kulturschale keine relevante Zellvermehrung. Im Vergleich dazu konnte im gleichen Bereich der Schwämme, die auf der gasdurchlässigen Folie kultiviert wurden, ein Zellwachstum nachgewiesen werden. Dieses stellte sich jedoch deutlich weniger zusammenhängend dar im Vergleich zur Oberfläche und den seitlichen Bereichen. Auch das beschriebene Einwachsverhalten zur Mitte des Schwamms konnte nicht nachgewiesen werden. Ähnliche Beobachtungen konnten beim Betrachten der mittleren Bereiche der jeweiligen Schwämme gemacht werden. Im Zentrum der Schwämme mit herkömmlichem Boden konnten ähnlich zum unteren Bereich keine Zellen dargestellt werden. Bei den Spongostan® - Schwämmen mit gasdurchlässigem Boden konnte im Zentrum lediglich ein sporadisches Auftreten von einzelnen Zellen beobachtet werden. Die Ausbildung von mehrschichtigen Zellkonglomeraten war nicht zu sehen.

Auf Grund des beobachteten Einwachsverhaltens bei beiden Versuchsansätzen ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Zellproliferation in direktem Zusammenhang mit einer ausreichenden Sauerstoff – und Nährstoffversorgung steht. An der Oberfläche der Spongostan® - Schwämme war bei beiden Ansätzen die Zellvermehrung am besten darzustellen. Zudem war an dieser Stelle die Organisation der Zellen in mehrschichtige zusammenhängende Verbände am stärksten ausgeprägt. Dabei stellte

sich der Unterschied zwischen herkömmlichem Kulturboden und gasdurchlässiger Folie am geringsten dar, da davon auszugehen war, dass an der Oberfläche der Schwämme die beste Sauerstoffversorgung vorliegt. Eine gleiche Interpretation ist für das Einwachsverhalten an den seitlichen Bereichen zulässig. Auch hier zeigten sich annähernd gleiche Proliferationsmuster. Die deutlichsten Unterschiede konnten an der Unterseite sowie im zentralen Bereich der jeweiligen Schwämme ausgemacht werden. An den Unterseiten der Spongostan® - Schwämme, die dem herkömmlichen Zellkulturboden direkt auflagen, zeigten sich keine relevanten Zellvermehrungen, was den Rückschluss zulässt, dass die Sauerstoffversorgung in diesem Bereich des Schwamms zu gering war oder sogar vollkommen ausblieb. Diese Annahme wird durch das Zellwachstum an gleicher Stelle bei den Schwämmen, die auf der gasdurchlässigen Folie kultiviert wurden, bestätigt. Die Sauerstoffversorgung wird durch die Membran zwar in geringerem Maße gewährleistet als an der Oberfläche, dennoch ist sie ausreichend, um ein deutliches Zellwachstum lichtmikroskopisch nachzuweisen. Die Sauerstoffversorgung aus dem unteren Teil des Schwamms scheint im Weiteren auch für die Zellproliferation im mittleren Teil des Spongostans® verantwortlich zu sein. Während die Schwämme mit herkömmlichem Boden in diesem Teil ebenso keine relevante Proliferation zeigten, waren in den Schwämmen der gasdurchlässigen Folie zumindest sporadisch vorkommende Zellen nachweisbar.

Ein gleichmäßiges Einwachsverhalten in das Spongostan® - Gerüst lässt sich nach diesen Ergebnissen nur durch eine seitengleiche Sauerstoffversorgung erreichen. In dieser Studie erfolgte keine Seitenumlagerung der Spongostan® - Schwämme zwischen den einzelnen Mediumwechseln, so dass die unteren Flächen der Schwämme über den gesamten Beobachtungszeitraum dem jeweiligen Zellkulturboden auflagen. Eine Umlagerung der Ebenen zwischen den verschiedenen Mediumwechseln könnte eine gleichmäßige Sauerstoffversorgung eher gewährleisten.

Eine weitere Fragestellung ergibt sich aus der zeitlichen Kultivierungsdauer. Diese Studie zeigt das Einwachsverhalten und die Organisation der Zellverbände nach einem Beobachtungszeitraum von 3 Wochen. Ein stärker ausgeprägtes Zellwachstum gerade in den Bereichen, in denen sich in dieser Studie nur eine sporadische Proliferation zeigte, könnte eventuell durch einen längeren Kultivierungszeitraum erreicht werden. Da sich allerdings besonders die oberflächlichen Bereiche des Spongostans® nach 3 Wochen durch eine mehrschichtige zusammenhängende Organisation der Zellen darstellten, scheint ein Versuchszeitraum von 3 Wochen ausreichend zu sein und die Zielsetzung am ehesten in einer gleichmäßig verteilten Sauerstoffversorgung des Spongostan® - Gerüst zu liegen.

In der Literatur werden sowohl zahlreiche in vitro Zellkulturmodelle als auch in vivo Studien zum dreidimensionalen Einwachsverhalten in potenzielle Trägersubstanzen als Knochenersatzstoffe beschrieben. Dabei gilt eine dreidimensionale Anordnung der Zellen hinsichtlich eines osteogenen Differenzierungsprozesses generell als günstig [Kale 2000]. Neben der dreidimensionalen Beschaffenheit ist ebenso die Größe der einzelnen Poren des Trägergerüsts einer der wichtigsten Faktoren für die Infiltration von Zellen, welche im Durchschnitt mit 200 – 400 µm angegeben wird [Eggli 1988].

Niemeyer et al kultivierten mesenchymale Stammzellen auf einer dreidimensionalen Kollagenmatrix und konnten nach einem Beobachtungszeitraum von 24 Tagen ähnlich der vorliegenden Studie vorwiegend an der Oberfläche des Gerüsts ein Zellwachstum nachweisen (9 von 10 Schnitten). In 3 von 10 Schnitten gelang zudem ein deutliches Zellwachstum in der Mitte der Matrix. Die dabei verwendete Matrixgröße war mit 5 x 5 x 2 mm allerdings erheblich kleiner gewählt, was die Infiltration der Zellen in tiefer gelegene Bereiche des Gerüsts möglicherweise erleichterte [Niemeyer 2003].

In einer weiteren in vitro Studie wurden humane osteoblastäre Zellen auf dem aus bovinem Knochen hergestellte Knochenmineral Bio - Oss®/ Orthos® kultiviert. In der Phasenkontrastmikroskopie konnte nach einer Kultivierungsdauer von 3 Monaten

neben einer dichten Zellreihe an der Oberfläche auch eine Brückenbildung in dem dreidimensionalen Porensystem beobachtet werden, welche sich zu einem früheren Zeitpunkt deutlich weniger ausgeprägt darstellte [Behrens 2000].

Auch die auf Gelatine basierenden Trägersubstanzen sind in der Literatur bezüglich des dreidimensionalen Einwachsverhaltens beschrieben. Eine tierexperimentelle Studie, bei der osteoblastäre Zellen aus dem Beckenkamm von Merinoschafen gewonnen wurden und Spongostan® als Trägermatrix verwendet wurde, zeigten bei 7 mm kleinen Bohrlochdefekten am Femur nach 12 Wochen eine signifikante Knochenheilung durch die Transplantation [Schneider1998].

Tamura et al konnten bei der Kultivierung der osteoblastischen Zelllinie MC3T3-E1 auf dem Gelatine – Schwamm PGS bereits nach 1 Woche ein gutes Zellwachstum feststellen. Nach 2 Wochen zeigte sich bereits eine deutlich höhere Zelldichte und die Ausbildung eines zellulären Netzwerkes in dem dreidimensionalen Matrixgerüst. Mit 1,5 mm Dicke und 4 mm Durchmesser war das kreisrund geschnittene Gerüst auch erheblich kleiner gewählt als in der vorliegende Studie [Tamura 2001].

Ähnliche Ergebnisse konnten Ponticiello et al in einem Tiermodell erzielen, bei dem mesenchymale Stammzellen auf dem Gelatine – Schwamm Gelfoam kultiviert und anschließend in osteochondrale Defekte an Femurkondylen bei Hasen implantiert wurden [Ponticiello 2000].

Bei allen in vivo Studien, die nach vergleichbarer Methodik aufgebaut sind, ist es jedoch ungewiss, ob das beobachtete Zellwachstum in den Trägersubstanzen von den aufgetragenen osteoblastären Zellen entsteht oder aber Zellen aus dem umliegenden Gewebe in das jeweilige Material einwandern.

4.3 Knochen – und Vitalitätsmarker

4.3.1 Laktatdehydrogenase

Die Laktatdehydrogenase wurde als Parameter für das Ausmaß der Zellschädigung in den Zellkulturen gewählt. So konnte eine eventuelle Zytotoxizität durch die Exposition der Gelatine – Schwämme Spongostan® sowie eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellkulturen überprüft werden.

In allen durchgeführten Zellkulturen inklusive der beschriebenen Kontrollkulturen zeigte sich einheitliches Bild bezüglich der LDH – Konzentrationen. So konnte in den überwiegenden Kulturen die Laktatdehydrogenase überhaupt nicht festgestellt werden und erfolgte am ehesten sporadisch. In vereinzelten Kulturen, in denen die Zellen auf Spongostan® ausgesät und auf der gasdurchlässigen Lumox dish kultiviert wurden, konnten leicht erhöhte Konzentrationen der LDH bestimmt werden. Eine erhöhte Laktatdehydrogenase als Zeichen eines stattgefundenen Zelltods kann durch verschiedene Ursachen bedingt sein. Erhöhte Laktatwerte sowie eine Erniedrigung des pH – Werts sind in Erwägung zu ziehen. Die Feststellung des pH – Wertes über den Versuchszeitraum wurde in dieser Studie versäumt, sollte bei weiterführenden Studien allerdings mit berücksichtigt werden. Weitere Ursachen für eine erhöhte Laktatdehydrogenase könnten auch toxische Einflüsse der verwendeten Materialien sein sowie eine Unterversorgung der Zellkultur. Der durchgeführte MTT – Test konnte in dieser Studie eine toxische Wirkung der Gelatine - Schwämme auf das Proliferationsverhalten der Zellen weitestgehend ausschließen. Andernfalls hätte ein zytotoxischer Effekt eine erhöhte LDH – Konzentration gerade zu Beginn des Versuchs erwarten lassen. Eine LDH – Erhöhung aufgrund einer Sauerstoffunterversorgung wäre am ehesten noch in den Zellkulturen der herkömmlichen Nunc – Zellkulturschale zu erwarten gewesen, da durch die gasdurchlässige Membran der Lumox – Kulturschale eine bessere Versorgung mit Sauerstoff anzunehmen ist.

Da Zellen bei in vitro Verhältnissen von der Anwesenheit eines Nährmediums abhängig sind und ein vermindertes Angebot zum Zelltod und zur Erhöhung der Laktatdehydrogenase führt, lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass die Zellkulturen über den gesamten Versuchszeitraum ausreichend mit Nährmedium versorgt waren. Dabei scheint ein Mediumwechsel alle 48 Stunden wie hier durchgeführt angemessen.

4.3.2 Osteocalcin und Calcium

Osteocalcin und Calcium konnten sowohl auf Grund ihrer Funktion als osteogene Marker als auch ihrer Konzentrationen, die im Verlauf dieser Studie bestimmt wurden, gemeinsam betrachtet werden. Beide Werte wurden untersucht, um eine eventuelle Kalzifikation der Zellkulturen näher betrachten zu können.

Eine stattgefunden Kalzifikation konnte jedoch über den gesamten Beobachtungszeitraum anhand der Osteocalcin – und Calcium – Konzentrationen nicht nachgewiesen werden. So zeigten sich mit minimalen Schwankungen in allen untersuchten Zellkulturen ähnlich niedrige Werte wie sie in der Kontrollkultur mit Medium gemessen werden konnten. Auch bezüglich der Beschaffenheit des Bodens der Kulturschalen konnten keine Unterschiede gemacht werden.

Dies konnte auch in anderen Studien belegt werden. Tamura et al untersuchten diesbezüglich osteoblastische Zellen, die sie auf einem ebenfalls auf Gelatine basierendem Schwamm (PGS) kultivierten. Dabei konnten ohne den Zusatz weiterer Wachstumsfaktoren keine Konzentrationen von Osteocalcin oder alkalischer Phosphatase (ALP), ein weiterer osteogener Marker, nachgewiesen werden. Unter Zugabe von bone morphogenetic protein (BMP) konnten bei sonst gleichem Versuchansatz deutliche Konzentrationen dieser osteogenen Marker nachgewiesen

werden [Tamura 2001]. Histologisch zeigte sich in ihrer Studie auch eine deutliche Zunahme der Zelldichte unter dem Einfluss von BMP.

Bone morphogenetic proteins werden in der Literatur als potente Faktoren gesehen, Knochenformationen zu induzieren und die Differenzierung von Osteoblasten zu stimulieren [Chen 1997, Sampath 1992, Yamaguchi 2000].

In einer teirexperimentellen in vivo Studie wurde der osteogene Effekt von bone morphogenetic proteins auch histologisch belegt. BMP wurden auf dem Gelatine – Schwamm PGS ausgesät und in kleinere alveolare Defekte bei Ratten implantiert. Dabei zeigten sich in den histologischen Kontrollen nach einer Woche Osteoblasten und nach zwei Wochen neu gebildete Knochenformationen um das Gelatine – Implantat [Shimazu 2006].

4.4 Zytokine

Die Freisetzung der in dieser Studie ermittelten Zytokine erfolgte einem einheitlichen Muster. Dabei ergaben sich bei allen untersuchten Parametern (TNF – α , IL – 6, IL – 8) anhand der statistischen Auswertungen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Versuchsansatz mit herkömmlicher Zellkulturschale und der Kulturschale mit dem gasdurchlässigen Folienboden. Daraus konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die bessere Sauerstoffversorgung der Zellkultur durch den gasdurchlässigen Boden zwar einen positiven Effekt auf das Einwachsverhalten der Zellen in den Spongostan® - Schwamm besitzt, jedoch keinen statistischen Unterschied auf die Expression der Zytokine ausmacht. In allen untersuchten Zellkulturen konnte zudem ein vergleichbarer Anstieg der Zytokin – Konzentrationen beobachtet werden. Alle Kulturen zeigten am Tag der 7. und 8. Mediumwechsel den höchsten Anstieg der Konzentrationen. Von diesem Zeitpunkt

an blieben die Werte der Zytokine in einer Plateauphase bis zum Ende des Beobachtungszeitraums. Daraus ließen sich zwei Hypothesen ableiten. Der permanente Anstieg der Zytokin – Konzentrationen ist in erster Linie als ein Indikator für stetiges Zellwachstum anzusehen. Diese Hypothese wird von anderen Autoren bestätigt [Mitchell 1999] und kann in dieser Studie zusätzlich durch die lichtmikroskopischen Aufnahmen bestätigt werden. Zum anderen könnte die Plateauphase, die sich bei den Konzentrationen ab dem 7./8. Mediumwechsel darstellte, ein Hinweis auf ein Erreichen eines maximalen Zellwachstums sein. So könnte der Spongostan® - Schwamm selbst für ein Sistieren des Zellwachstums und damit der Zytokin - Konzentrationen verantwortlich sein. Die Zellen wuchsen wie in der Lichtmikroskopie gesehen gut in den Schwamm ein, erreichten allerdings hierbei ein gewisses Maximum. So könnte ein Erklärungsversuch darin bestehen, dass die Zellen sich selbst im Laufe des Beobachtungszeitraums den Raum für eine weiterreichende Proliferation nehmen und damit auch die Konzentrationen der Zytokine auf dem beobachteten Plateau sistieren. Als Bestätigung für diese Hypothese konnten die Kontrollkulturen dienen, in denen die MG63 – Zellen ausschließlich im Medium ohne Spongostan® - Schwämme kultiviert wurden. Hier konnte insbesondere bei den IL – 8 Konzentrationen eine stetige Zunahme der Werte über den gesamten Zeitraum auch über den 7. und 8. Mediumwechsel hinaus festgestellt werden. Im Rahmen der formulierten Hypothese war das Wachstum und die Ausschüttung der Zytokine in diesen Kontrollkulturen nicht von einem Spongostan® - Schwamm begrenzt.

In der Literatur sind keine vergleichbaren Zellkulturmodelle bekannt, bei denen bei der Kultivierung von MG63 – Zellen auf Spongostan® - Schwämmen Zytokinprofile erstellt wurden. Dennoch konnten in der vorliegenden Studie Erkenntnisse über eine Zytokinexpression gemacht werden, die mit anderen Studien zu vergleichen sind. Anhand der Kontrollkulturen, in denen nur MG63 – Zellen im Medium ohne Spongostan® kultiviert wurden, konnte eine basale Ausschüttung von IL – 6, IL – 8 und TNF – α festgestellt werden. Verschiedene Studien konnten dies bereits im

Vorfeld zeigen [Chaudhary 1994, Siddiqi 1998, Sohrabi 2000, Cenni 2001]. Sohrabi et al (2000) konnten zusätzlich eine basale Ausschüttung von IL - 1 β bei der Zelllinie MG63 nachweisen. Dies zu bestätigen wurde in dieser Studie verfehlt. Dennoch ergibt sich daraus ein weiterer Diskussionspunkt. Chaudhary und Avioli (1994) konnten zeigen, dass IL - 1 β und TNF - α die Produktion von IL - 8 sowohl in MG63 - Zellen, humanen Knochenmarkszellen als auch in humanen Osteoblasten induziert. Haynes et al (1997) beschrieben auch eine erhöhte Freisetzung von IL - 6 sowie eine Hemmung der Osteoblasten - Differenzierung durch TNF - α . In den Kontrollkulturen dieser Studie, in denen nur das Medium RPMI 1640 kultiviert wurde, konnten niedrige TNF - α Spiegel nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer gegenseitigen Up - Regulation zumindest der IL - 8 Konzentrationen durch TNF - α und IL - 1 β auch in dem vorliegenden Modell. In gleicher Studie wurden auch die Effekte von Glukokortikoiden diesbezüglich beschrieben [Chaudhary 1994]. So konnte durch die Zugabe von Dexamethason die Produktion von IL - 8 signifikant gesenkt werden. Der Gebrauch von Glukokortikoiden in einem Zellkulturmodell sowie die Verwendung eines Mediums, welches nicht über einen eigenen Gehalt an TNF - α verfügt, könnten in einem Modell, welches sich dem vorliegenden anschließt, zu erweiterten Ergebnissen führen.

V. Zusammenfassung

Knochendefekte stellen in der modernen Unfall- und Tumorchirurgie immer noch ein großes Problem dar. Zurzeit gilt der autologe Knochenersatz, meistens aus Beckenkamm gewonnen, als Goldstandard in der Behandlung von Knochendefekten. Diese Behandlung ist allerdings mit einer Anzahl von Komplikationen behaftet wie etwa ein nötiger Zweiteingriff und Infektionen. Aus diesem Grund besitzt die Grundlagenforschung nach alternativen Knochenersatzmaterialien einen zentralen Stellenwert.

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Studie das dreidimensionale Einwachsverhalten von Osteoblasten – like cells (MG63) in das seit vielen Jahren in klinischer Anwendung befindliche Hämostyptikum Spongostan® untersucht. Dabei verfolgte diese Studie in erster Linie einen deskriptiven beschreibenden Ansatz, der keinen Indikator für eine klinische Anwendung oder als Behandlung von Knochendefekten darstellen sollte. Die Beobachtung des Einwachsverhaltens der Zellen in das Spongostan® stand dabei im Vordergrund. Die in dieser Studie verwendeten MG63–Zellen besitzen einen transformierten Phänotyp. Im Gegensatz zu primären Nativkulturen, zeichnen sich transformierte Zellen durch ein unbegrenztes Wachstum aus und das Fehlen der Kontaktinhibition.

Bei ansonsten gleichen Versuchsbedingungen wurden zwei verschiedenen Zellkulturschalen für das Zellmodell verwendet und miteinander verglichen. Eine Zellkulturschale mit gasdurchlässigem Folienboden sollte im Vergleich zu einer herkömmlichen Kulturschale Aufschlüsse über die Auswirkungen einer verbesserten Sauerstoffversorgung im Modell liefern. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 3 Wochen bei einem regelmäßigen Mediumwechsel alle 48 Stunden. Aus dem gewechselten Medium wurden über den gesamten Zeitraum verschiedene Parameter analysiert. Um eine eventuelle Kalzifikation zu beurteilen wurden als osteogene Marker Osteocalcin und Calcium bestimmt. Als proinflammatorische Zytokine, die

eine Knochendestruktion durch direkte oder indirekte Osteoklastenaktivität begünstigen, wurden IL – 6, IL – 8 und TNF – α bestimmt. Eine Beurteilung des Einwachsverhaltens erfolgte nach Ablauf des Beobachtungszeitraums anhand von lichtmikroskopischen Aufnahmen der zuvor in Paraffin eingebetteten und geschnittenen Spongostan® - Schwämme.

In den lichtmikroskopischen Aufnahmen konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den auf unterschiedlichen Zellkulturschalen kultivierten Versuchsreihen festgestellt werden. Während sich an den Unterseiten der Schwämme, die auf dem herkömmlichen Folienboden auflagen, kein Einwachsen der Zellen zeigte, konnte dieses an gleicher Stelle bei den Schwämmen, die dem gasdurchlässigen Folienboden auflagen, deutlich beobachtet werden. Eine Kalzifikation konnte anhand der Osteocalcin – Konzentrationen in keiner Kultur nachgewiesen werden. Alle Zytokine erreichten nach etwa der Hälfte der Versuchsdauer eine Plateauphase und konnten am ehesten als Indikator für ein stetiges Zellwachstum herangezogen werden.

Spongostan® ist generell als Trägersubstanz für einwachsende Zellen geeignet und verfügt über ein hohes Maß an Biokompatibilität gegenüber den Zellen. Im Vergleich zu den Kontrollkulturen reagierten die Zellen weder mit einer erhöhten Zytokinausschüttung im Sinne einer proinflammatorischen Reaktion, noch war ein erhöhtes Zellsterben in Gegenwart von Spongostan® zu beobachten.

In Bezug auf das Einwachsen und das Verhalten auf Biomaterialien, wie es in dieser Studie untersucht wurde, lässt sich abschließend sagen, dass die verwendeten MG63–Zellen keinen geeigneten Indikator für eine klinische Verwendung darstellen.

Summary

Osseous defects still remain a challenge to modern traumatology and tumor surgery. The use of autologous bone – gained from the iliac crest – is regarded as golden standard for the treatment of osseous defects. The treatment contains the possibility of complications such as the risk of a second surgical intervention and a further infection as a result. Therefore the fundamental research of alternative bone materials is of special interest.

The study examines the three-dimensional ingrowth of Osteoblast like cells (MG63) in hemostatic Spongostan® which is used in clinical practice for several years.

In the first place this study is supposed to show a descriptive approach and not to demonstrate an indicator of clinical application or treatment of osseous defects. Thereby observation of cell ingrowth in Spongostan® was the main aspect.

The MG63 cells used in the study have a transformed phenotype. Compared to primary native cultures transformed cells are characterized by unlimited growth and missing of contact inhibition.

The trial contains the comparison of two different cell culture dishes by otherwise identical test conditions. With the objective of offering valuable clues to the impact of an improved oxygen supply by using a cell culture dish with a gas-permeable film bottom compared to a cell culture dish with a regular bottom. During the three week observation period medium was changed every 48 hours. Over the whole period several parameters were regularly taken and analysed. In order to evaluate the calcification osteogenic marker such as osteocalcin and calcium were measured. As proinflammatory cytokines who facilitate bone destruction through direct or indirect osteoclasts activity were IL-6, IL-8 and TNF- α identified. The assessment of ingrowth development of the paraffin-bedded and cut Spongostan®- sponges was made after the observation period relating to light microscope.

Investigating these light microscopic pictures a difference between the in two different cell culture dishes cultivated test series could be identified. The under surface of the sponges lying on regular film bottom showed no ingrowth of cells whereas the sponges on gas-permeable film developed cells. A calcification was not detected relating to concentration of osteocalcin in any of cell cultures.

All cytokines reached a plateau within half time of the study period and could be related to as an indicator of continuing cell growth.

Spongostan® is generally applicable as scaffold for cell ingrowth and offers a high level of biocompatibility. In comparison to the control cultures the cells reacted neither with a higher release of cytokines in form of a proinflammatory reaction nor with a increased demise of cells under the use of Spongostan®.

In terms of ingrowth and behaviour on biomaterials MG63 cells are not a good indicator of clinical performance.

VI. Literaturverzeichnis

Abercrombie M, Dunn GA (1975) Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. Exp Cell Res 92: 57- 62

Behrens P, Wolf E, Bruns J (2000) In vitro formation of human autologous osteoblast like – cells on natural bone mineral. Orthopäde 29: 129- 134

Bendre MS, Montague DC, Peery T, Akel NS, Gaddy D, Suva LJ (2003) Interleukin – 8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. Bone 33 (1) : 28- 37

Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR (1986) Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. Nature 319: 516- 518

Billiau A, Edy VG, Heremans H, Van Damme J, Desmyter J, Georgiades JA, De Somer P (1977) Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG63. Antimicrob Agents Chemother 12 (1): 11- 15

Bolander ME, Balian G (1986) The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts. J Bone Joint Surg 68: 1264- 1274

Bonewald LF, Kester MB, Schwartz Z, Khare A, Johnson TL, Leach RJ, Boyan BD (1992) Effects of combining transforming growth factor – beta and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on differentiation of a human osteosarcoma (MG63). J Biol Chem 267: 8943- 8949

Bosworth DM (1955) Repair of herniae through iliac – crest defects. J Bone Joint Surg 37A: 1069

Boyan BD, Batzer R, Kieswetter K, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler – Monclar S, Dean DD, Schwartz Z (1997) Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast – like cells to 1 α ,25-(OH)₂D₃. J Biomed Mater Res 39 (1): 77- 85

Bray D (2001) Cell movements from molecules to motility. Garland Publishing, New York. 119- 120

Buchholz RW, Carlton A, Holmes R (1989) Interporous hydroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. Clin Orthop 240: 53- 62

Buck BE, Malinin TI, Brown MD (1989) Bone transplantation and human immunodeficiency virus: an estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Clin Orthop 240: 129- 136

Bush LF (1947) The use of homogenous bone graft. A preliminary report of the bone bank. J Bone Joint Surg 29: 620- 628

Catinella FP, De Laria GA, De Wald RL (1990) False aneurysm of the superior gluteal artery. A complication of iliac crest bone grafting. Spine 15: 1360

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin – induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci 72(9): 3666- 3670

Cenni E, Granchi D, Ciapetti G, Stea S, Savarino L, Corradini A (2001) Interleukin – 6 expression by osteoblast – like MG63 cells challenges with four acrylic bone cements. J Biomater Sci Polym Ed 12(2): 243- 253

Center for Disease Control and Prevention (1988) Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. MMWR 37: 595- 599

Center for Disease Control and Prevention (2002) Update: Allograft – Associated Bacterial Infections. MMWR 51 (10): 207- 210

Challis JH, Lyttle JA, Stuart AE (1975) Strangulated lumbar hernia and volvulus following removal of iliac crest bone grafting. Acta Orthop Scand 46: 320

Chaudhary LR, Avioli LV (1994) Dexamethasone regulates IL - 1β and TNF – α induced IL – 8 production in human bone marrow stromal and osteoblastic – like cells. Calcif Tissue Int 55: 16- 20

Chen WT (1981) Surface changes during retraction- induced spreading of fibroblasts. J Cell Sci 49: 1- 13

Chen D, Harris MA, Rossini G, Dunstan CR, Dallas SL, Feng JQ, Mundy GR, Harris SE (1997) Bone morphogenetic protein 2 (BMP – 2) enhances BMP – 3, BMP – 4 and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 60: 283- 290

Christenson RH (1997) Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 30: 573- 593

Clover J, Gowen M (1994) Are MG63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? *Bone* 15 (6): 585- 591

Conrad EU, Gretschi DR, Obermeyer KR (1995) Transmission of the hepatitis C virus by tissue transplantation. *J Bone Joint Surg* 77- A: 214- 224

Devlin RD, Reddy SV, Savino R, Ciliberto G, Roodman GD (1998) IL – 6 mediates the effects of IL – 1 or TNF, but not PTHrP or 1,25(OH)₂D₃, on osteoclast – like cell formation in normal human bone marrow cultures. *J Bone Miner Res* 13 (3): 393- 399

Dodds RA, Merry K, Littlewood A, Gowen M (1994) Expression of mRNA of IL1 beta, IL6 and TGF beta 1 in developing human bone and cartilage. *J Histochem Cytochem* 42 (6): 733- 744

Doppelt SH, Tomford WW, Lucas AD, Mankin HJ (1981) Operational and financial aspects of a hospital bone bank. *J Bone Joint Surg* 63-A: 244- 249

Durum SK, Muegge K (1998) Cytokines Linkin the Immune and Inflammatory Systems: IL – 1, TNF, IL – 6, IFN – α and TGF – β . In Robert R. Rich, Thomas A. Fleisher, Benjamin D. Schwartz, William T. Shearer and Warren Strober (eds), Clinical Immunology, pp 350. St. Louis, Mosby

Eggen BM, Nordbo SA (1992) Transmission of HCV by organ transplantation (letter). N Eng J Med 326: 411

Elson EL, Felder SF, Jay PY, Kolodney MS, Pasternack C (1999) Forces in cell locomotion. Biochemical Society Symposium. Vol. 65, J.M. Lackie, G.A. Dunn and G.E. Jones, editor, Oxford, England. 299- 314.

Eggli PS, Müller W, Schenk RK (1988) Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. Clin Orthop 232: 127- 138

Flad HD, Gemsa D (1997) Zytokine. In Gemsa, D. (ed), Immunologie Grundlagen – Klinik – Praxis, 4 ed., pp 45- 69. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Franceschi RT, James WM, Zerlauth G (1985) $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 specific regulation of growth, morphology and fibronectin in a human osteosarcoma cell line. J Cell Physiol 123: 401- 409

Franceschi RT, Linson CJ, Peter TC, Romano PR (1987) Regulation of cellular adhesion and fibronectin synthesis by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 . J Biol Chem 262: 4165- 4171

v.Garrel T, Gotzen L (1998) Allogene Knochentransplantation und Knochenbanking. Unfallchirurg 101: 713- 727

Gearing AJ, Fincham NJ, Bird CR, Wadhwa M, Meager A, Cartwright JE, Camp RD (1990) Cytokines in skin lesions of psoriasis. Cytokine 2 (1): 68- 75

Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN (2001) American Academy of Orthopaedic Surgeons. The Committee on Biological Implants. Bone – graft substitutes: facts, fictions and applications. J Bone Joint Surg 83-A: 98- 103

Groessner – Schreiber B, Tuan RS (1992) Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surface in vitro. J Cell Sci 101: 209- 217

Guha SC, Poole MD (1983) Stress fracture of the iliac bone with subfascial femoral neuropathy: unusual complications at the bone graft donor site: case report. Br J Plast Surg 36: 305

Hamad MM, Majeed SA (1989) Incisional hernia through iliac crest defects. A report of three cases with a review of the literature. Arch Orthop Trauma Surg 108: 383

Haynes DR, Hay SJ, Rogers SD, Otha S, Howie DW, Graves SE (1997) Regulation of bone cells by particle – activated mononuclear phagocytes. J Bone Joint Surg Br. 79: 988- 994

Hiney KM, Potter GD, Gibbs PG, Bloomfield SM (2000) Response of serum biochemical markers of bone metabolism to training in the juvenile racehorse. J Equine Vet Sci 20: 851- 857

Houben R, Soute BA, Knapen MH, Vermeer C (1997) Strategies for developing human osteocalcin standards: a critical evaluation. Scand J Clin Lab Invest Suppl 227: 100- 104

Hyatt GW (1950) Fundamentals in the use and preservation of homogenous bone. U.S. Armed Forces Medical J 1: 841- 852

Hyatt GW, Turner TC, Bassett CAL, Pate JW, Sawyer PN (1952) New methods for preserving bone, skin and blood vessels. Postgrad Med 12: 239- 254

Inclan A (1942) Use of preserved bone graft in orthopaedic surgery. J Bone Joint Surg 24: 81- 96

James JIP (1953) Tuberculosis transmitted by banked bone. J Bone Joint Surg 35-B: 578- 586

Jergesen HE, Chua J, Kao RT, Kaban LB (1991) Age effects on bone induction by demineralized bone powder. Clin Orthop 268: 253- 259

Jilka RL, Hangoc C, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC (1992) Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin – 6. Science 257 (5066): 88- 91

Jones DB, Leiveth G, Tenbosch J (1995) Mechano- reception in osteoblast- like cells. Biochem Cell Biol 73: 525- 534

Jones DB, Scholuebbbers JG (1989) A role for PI-phospholipase C in the medium of mechanical stress in bone surface cells. *Calcif Tiss Int* 44(supp), S-97, P6

Jones DB, Nolte H, Scholuebbbers JG, Turner E, Veltel D (1991) Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast- like cells. *Biomaterials* 12: 110- 112

Jones DB, Bingmann D (1991) How do osteoblasts respond to mechanical stimulation? *Cells and materials* 1(4): 329- 340

Kakaiya R, Miller WV, Gudino MD (1991) Tissue – transplant – transmitted infections. *Transfusion* 31(3): 277- 284

Kale S, Biermann S, Edwards C, Tarnowski C, Morris M, Long MW (2000) Three – dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone. *Nat Biotechnol* 18: 954- 958

Kos M, Staniszevska – Kus J, Matusiewicz M, Luczak K, Klempous R, Pielka S (2003) Tissue reaction after implantation of Spongostan, as the carrier of xenogenic bone morphogenetic protein. Experimental study. *Polim Med* 33 (1-2): 25- 33

Lajeunesse D, Frondoza C, Schollfield B, Sacktor B (1990) Osteocalcin secretion by the human osteosarcoma cell line MG63. *J Bone Miner Res* 5: 915- 922

Lajeunesse D, Kiebzak GM, Frondoza C, Sacktor B (1991) Regulation of Osteocalcin secretion by human primary bone cells and by human osteosarcoma cell line MG63. *Bone and Miner* 14: 237- 250

Lee JY, Kim KH, Shin SY, Rhyu IC, Lee YM, Park YJ, Chung CP, Lee SJ (2006) Enhanced bone formation by transforming growth factor- β - 1 releasing collagen/chitosan microgranules. J Biomed Mater Res A 76(3): 530- 539

Lexer E (1908) Die Verwendung der freien Knochenplastik nebst Versuchen über Gelenkversteifung und Gelenktransplantation. Archiv für klinische Chirurgie 68: 940- 948

Lexer E (1911) Über freie Transplantationen. Langenbecks Archiv für Chirurgie 95: 827- 851

Lexer E (1925) Joint transplantation and arthroplasty. Surg Gynecol Obstet 40: 782- 795

Light R, Prentice H (1945) Surgical investigation of a new absorbable sponge derived from gelatine for use in haemostasis. J Neurosurg 2: 435- 455

Mac Ewen W (1881) Observations concerning transplantation of bone; illustrated by a case of inter – human osseous transplantation, whereby over two thirds of the shaft of a humerus was restored. Proc Royal Soc (London) 32: 232- 247

Manolagas SC, Jilka RL (1995) Bone marrow, cytokines and bone remodelling. N Engl J Med 332: 305- 311

Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD (1995) Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation and protein synthesis of human osteoblast – like cells (MG63). J Biomed Mater Res 29: 389- 401

van Meekeren J (1668) Heel- en geneeskonstige aan merkingen. Commelijn, Amsterdam. Zitiert nach [De Boer (1989)]

Mitchell PJC, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F (1999) Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 20: 167- 173

Morey-Horton E, Arnaud SB (1985) Spaceflight and calcium metabolism. *The physiologist* 28: 9- 12

Naruse K, Yamada T, Sokabe M (1998) Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cycle stretch. *Am J Physiol* 274: H1532-1538

Niemeyer P, Krause U, Punzel M, Fellenberg J, Simank HG (2003) Mesenchymal stem cells for tissue engineering of bone: 3D – cultivation and oeteogenic differentiation on mineralized collagen. *Z Orthop* 141: 712- 717

Nicolas V, Prewett A, Bettica P, Mohan S, Finkelmann RD, Baylink DJ, Farley JR (1994) Age – related decreases in insulin – linke growth factor – 1 and transforming growth factor – beta in femoral cortical bone from both men and women; implications for bone loss with aging. *J Clin Endocrinol Metab* 78(5): 1011-1016

Okada H, Murakami S (1998) Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 9: 248- 266

Paganelli C, Fontana P, Porta F, Majorana A, Pazzaglia UE, Sapelli PL (2006) Indications on suitable scaffold as carrier of stem cells in the alveoloplasty of cleft palate. *J Oral Rehabil* 33 (8): 625- 629

Patka P, Haarman HJ, Bakker FC (1998) Bone transplantation and bone replacement materials. Ned Tijdschr Geneesk 142(6): 893- 896

Parrish FF (1973) Allograft replacement of all or part of the end of a long bone following excision of a tumor. J Bone Joint Surg 55- A: 1- 22

Peter A, Pichler WJ (1996) Zytokine. In: Klinische Immunologie, 2. Auflage Urban Schwarzenberg Verlag: 35- 51

Peterson LJ, Ellis E, Hupp JR, Tucker MR (1988) Contemporary oral and maxillofacial surgery. 1st edn. St. Louis: The C.V Mosby Co: 331

Ponticiello MS, Schinagel RM, Kadiyala S, Barry FP (2000) Gelatin – based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. J Biomed Mater Res 52: 246- 255

Price PA, Otsuka AS, Poser JW, Kristponis J, Raman N (1976) Characterization of the gamma – carboxyglutamic acid containing protein from bone. Proc Natl Acad Sci 73: 1447- 1451

Richtlinie 2004/23/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 31.03.2004 zur „Festlegung von Qualitäts- und Sicherheitsstandards für die Spende, Beschaffung, Testung, Verarbeitung, Konservierung, Lagerung und Verteilung von menschlichen Geweben und Zellen.“ Official Journal of the European Union, L 102/58, 07.04.2005

Riegels – Nielsen P, Greiff J, Lovgreen Nielsen P (1986) Spongostan used for space obliteration in bone defects. Acta Orthop Belg 52: 46- 53

Risteli L, Risteli J (1993) Biochemical markers of bone metabolism. *Annals Med* 25: 385- 393

Robins SP, New SA (1997) Markers of bone turnover in relation to bone health. in: Symposium on “ Nutritional aspects of bone” *Proc Nutr Soc* 56: 903- 914

Roodman GD (1992) Interleukin – 6: An osteotropic factor? *J Bone Miner Res*: 475- 478

Saad B, Kuboki Y, Welte M, Uhlschmid GK, Neuenschwander P, Suter UW (2000) Degra Pol-foam: a degradable and highly porous polyesterurethane foam as a new substrate for bone formation. *Artif Organs* 24(12): 939- 945

Salvi M, Girasole G, Pedrazzoni M, Passeri M, Giuliani N, Minelli R, Braverman L, Roti E (1996) Increased serum concentrations of IL – 6 and soluble IL – 6 receptor in patients with Graves disease. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2976- 2979

Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White KH, Coughlin JE, Tucker MM, Pang RH, Corbett C, Ozkaynak E, Oppermann H, Rueger DC (1992) Recombinant human osteogenic protein – 1 (hOP – 1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* 267: 20352- 2062

Schneider U (1998) Die autogene Knochentransplantation. *Orthopäde* 27: 143- 146

Schratt HE, Regel G, Kieseewetter B, Tscherne H (1996) HIV – Infektion nach allogener Knochentransplantation. Unfallchirurg 99: 679- 684

Shimazu C, Hara T, Kinuta Y, Moriya K, Maruo Y, Hanada S, Minagi S (2006) Enhanced vertical alveolar bone augmentation by recombinant human bone morphogenetic protein – 2 with a carrier in rats. J Oral Rehabil 33: 609- 618

Shutkin NM (1954) Homologous – serum hepatitis following the use of refrigerated bone – bank bone. Report of a case. J Bone Joint Surg 36- A: 160- 162

Siddiqi A, Burrin JM, Wood DF, Monson JP, (1998) Tri – iodothyronine regulates the production of interleukin – 6 and interleukin – 8 in human bone marrow stromal and osteoblast – like cells. J Endocrinol 157: 453- 461

Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL (1992) Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. N Eng J Med 326: 726- 732

Sohrabi A, Holland C, Kue R, Nagle D, Hungerford DS, Frondoza CG (2000) Proinflammatory cytokine expression of IL - 1 β and TNF – α by human osteoblast – like MG-63 cells upon exposure to silicon nitride in vitro. J Biomed Mat Res 50: 43- 49

Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N (1995) Modulation of osteoclast differentiation by local factors. Bone 17: 87- 91

Tamura S, Kataoka H, Matsui Y, Shionoya Y, Ohno K, Michi KI, Takahashi K, Yamaguchi A (2001) The effects of transplantation of osteoblastic cells with bone morphogenetic protein (BMP)/carrier complex on bone repair. Bone 29: 169- 175

Terheyden H, Jepsen S, Vogeler S, Tucker M, Rueger DC (1997) Recombinant human osteogenic protein – 1 in the rat mandibular augmentation model: differences in morphology of the newly formed bone are dependent on the type of carrier. Mund Kiefer Gesichtschir 1(5): 272- 275

Terheyden H, Jepsen S, Rueger DC (1999) Mandibular reconstruction in miniature pigs with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein – 1: a preliminary study. Int J Oral Maxillofac Surg 28(6): 461-463

Thomson BM, Mundy GR, Chambers TJ (1987) Tumor necrosis factor alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. J Immunol 138: 775- 779

Tsangari H, Findlay DM, Zannettino AC, Pan B, Kuliwaba JS, Fazzalari NL (2006) Evidence for reduced bone formation surface relative to bone resorption surface in female femoral fragility fracture patients. Bone 39 (6): 1226- 1235

Ubhi CS, Morris DL (1984) Fracture and herniation of bowel at bone graft donor site in the iliac crest. Injury 16: 202

Veen MR, Bloem RM, Petit P (1991) Bacteriology in bone banking (Abstract). 1st European Conference on Tissue Banking and Clinical Application: 20

Vidal – Ragout M – J (2000) Dem Geheimnis der Prionen auf der Spur. FTE – Info 25: 37- 39

Walter P von (1821) Wiedereinheilung der bei der Trepanation ausgebohrten Knochenscheibe. J Chir Augenheilkunde: 571- 582

Warnke PH, Springer IN, Acil Y, Julga G, Wiltfang J, Ludwig K, Russo PA, Sherry E, Sivananthan S, Hedderich J, Terheyden H (2006) The mechanical integrity of in vivo engineered heterotopic bone. Biomaterials 27(7): 1081- 1087

Wetzel AC, Stich H, Caffesse RG (1995) Bone apposition onto oral implants in the sinus area filled with different grafting materials. A histological study in beagle dogs. Clin Oral Implants 6(3): 155- 163

Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer (1996) Richtlinien zum Führen einer Knochenbank. Dtsch Ärztebl 93 34/35: 2166- 2171

Withold W (1996) Monitoring of bone turnover. Biological, preanalytical and technical criteria in the assessment of biochemical markers. Eur J Clin Chem Clin Biochem 34: 785- 799

Wozney JM, Rosen V (1998) Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. Clin Orthop 346: 26- 37.

Wronski TJ, Morey-Holton ER, Doty SB, Maese AC, Walsh CC (1987) Histomorphometric analysis of rat skeleton following spaceflight. Am J Physiol 252: 252- 255

Yamaguchi A, Komori T, Suda T (2000) Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs and Cbfa1. Endocrin Rev 21: 393- 411

Zinkernagel RM (1998) Grundlagen der Immunologie. In F.H. Kayser, K.A. Bienz, J. Eckert und R.M. Zinkernagel (eds), Medizinische Mikrobiologie, 9 ed., pp 81- 82. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

VII. Anhang

Osteocalcin - Konzentrationen (ng/ml) bei 700.000 Zellen MG63/Schwamm ohne gasdurchlässigen Folienboden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	5,29	5,58	4,86	5,02	5,14	5,13	5,16	4,84	5,08	4,87	4,75	4,94
2. Kultur	5,37	5,55	5,30	4,73	4,92	5,03	4,93	4,75	4,58	4,79	4,70	4,51
3. Kultur	5,06	5,36	4,96	5,02	4,89	4,78	5,06	4,70	4,72	4,85	4,76	4,61
4. Kultur	5,18	5,34	5,38	4,85	4,72	4,91	4,74	4,71	4,72	4,51	4,82	3,13
5. Kultur	4,94	5,11	5,05	5,01	4,96	4,86	4,69	4,74	4,86	4,63	4,46	4,21
6. Kultur	4,89	5,33	4,77	4,81	4,74	4,89	4,84	4,85	4,56	4,76	4,74	4,56
7. Kultur	4,97	4,98	4,90	4,93	4,79	4,75	4,88	4,89	4,48	4,51	4,46	4,53
8. Kultur	4,74	4,96	4,89	4,75	4,71	4,58	4,59	4,59	4,54	4,39	4,35	4,45
9. Kultur	4,83	5,07	5,06	4,99	4,83	4,90	4,71	4,72	4,54	4,34	4,57	4,43
10. Kultur	5,28	5,77	5,50	5,23	5,06	5,06	5,07	4,88	4,75	4,75	4,91	4,82

Mittelwert	5,05	5,30	5,06	4,93	4,87	4,88	4,86	4,76	4,68	4,64	4,65	4,41
Standardabw.	0,21	0,27	0,24	0,15	0,14	0,16	0,18	0,09	0,18	0,19	0,18	0,49

Osteocalcin - Konzentrationen (ng/ml) im Medium

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	5,06	4,59	4,55	4,62	4,58	4,64	4,90	4,51	4,66	4,86	4,67	4,95
2. Kultur	5,02	4,79	4,68	5,12	4,62	4,92	4,53	4,98	5,08	4,48	4,75	4,82
Mittelwert	5,04	4,69	4,61	4,87	4,60	4,78	4,71	4,74	4,87	4,67	4,71	4,88
Standardabw.	0,02	0,14	0,09	0,35	0,02	0,19	0,26	0,33	0,29	0,26	0,05	0,09

Osteocalcin - Konzentrationen (ng/ml) im Medium inklusive eines Spongostan – Schwamms

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	5,38	5,22	4,89	4,67	4,87	4,51	4,68	5,12	5,06	5,14	4,82	4,74
2. Kultur	5,04	5,14	5,05	4,86	4,93	5,37	5,25	4,88	5,12	4,93	4,86	5,02
Mittelwert	5,21	5,18	4,97	4,76	4,90	4,94	4,96	5,00	5,09	5,03	4,84	4,88
Standardabw.	0,24	0,05	0,11	0,13	0,04	0,60	0,40	0,16	0,04	0,14	0,02	0,19

Osteocalcin - Konzentrationen (ng/ml) in den Kulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	6,08	5,02	4,58	4,63	4,82	4,78	4,96	4,72	4,68	4,58	4,59	4,57
2. Kultur	6,32	5,18	4,70	5,08	5,27	5,14	5,21	5,05	5,16	4,98	4,94	4,93
Mittelwert	6,20	5,10	4,64	4,85	5,04	4,96	5,08	4,88	4,92	4,78	4,76	4,75
Standardabw.	0,16	0,11	0,08	0,31	0,31	0,25	0,17	0,23	0,33	0,28	0,24	0,25

Osteocalcin - Konzentrationen (ng/ml) in den Kulturen, in denen Spongostan und MG63 – Zellen ohne Überführung kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	5,78	5,34	4,98	4,74	5,02	4,98	4,86	4,88	4,75	4,70	4,65	4,58
2. Kultur	6,01	5,43	5,18	5,26	5,11	4,94	4,97	4,90	5,06	4,85	4,79	4,83
Mittelwert	5,89	5,38	5,08	5,00	5,06	4,96	4,91	4,89	4,90	4,77	4,72	4,70
Standardabw.	0,16	0,06	0,14	0,36	0,06	0,02	0,07	0,01	0,21	0,10	0,09	0,17

Osteocalcin - Konzentrationen (ng/ml) bei 700.000 Zellen MG63/Schwamm mit der Lumox dish gasdurchlässigen Kulturschale

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	5,49	5,69	5,14	5,49	5,30	5,24	5,33	4,95	4,76	4,75	4,82	4,69
2. Kultur	4,88	4,97	5,41	5,36	5,30	4,99	5,08	4,84	4,74	4,74	4,72	4,67
3. Kultur	5,36	5,39	5,23	5,18	4,87	5,06	5,17	5,12	5,13	5,05	5,21	4,74
4. Kultur	5,26	5,28	5,10	5,26	5,00	5,08	5,01	4,84	4,87	4,88	4,99	4,92
5. Kultur	4,88	4,93	4,99	4,78	4,88	4,95	5,35	4,58	4,77	4,90	4,75	4,73
6. Kultur	5,45	5,72	5,41	5,26	5,41	5,33	5,42	5,13	4,92	4,96	4,89	4,59
7. Kultur	5,35	5,59	6,01	5,95	5,95	5,02	5,26	5,27	5,13	4,99	5,11	4,72
8. Kultur	4,77	5,37	4,91	5,16	5,17	4,80	4,80	4,41	4,59	4,56	4,70	4,59
9. Kultur	4,80	4,60	4,63	4,80	4,74	4,80	5,03	4,89	5,16	4,92	4,97	4,72
10. Kultur	4,70	4,87	4,81	4,94	4,83	4,94	5,08	4,80	4,78	4,79	4,83	4,69

Mittelwert	5,09	5,24	5,16	5,21	5,14	5,02	5,15	4,88	4,88	4,85	4,89	4,70
Standardabw.	0,31	0,38	0,38	0,34	0,36	0,16	0,18	0,25	0,19	0,14	0,16	0,09

Osteocalcin - Konzentrationen (ng/ml) im Medium

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	5,00	4,47	4,65	4,91	4,73	4,76	4,61	4,87	4,64	5,05	4,71	4,74
2. Kultur	5,23	5,08	4,82	4,76	4,67	4,84	5,24	5,14	4,73	4,63	4,95	4,83
Mittelwert	5,11	4,77	4,73	4,83	4,70	4,80	4,92	5,00	4,68	4,84	4,83	4,78
Standardabw.	0,16	0,43	0,12	0,10	0,04	0,05	0,44	0,19	0,06	0,29	0,16	0,06

Osteocalcin - Konzentrationen (ng/ml) in den Kontrollkulturen inklusive eines Spongostan – Schwamms

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	5,18	5,01	4,89	4,99	4,63	4,87	5,17	5,21	4,68	4,72	4,69	5,09
2. Kultur	4,98	4,58	4,70	4,82	4,81	4,97	4,95	4,96	4,63	4,78	5,16	4,91
Mittelwert	5,08	4,79	4,79	4,90	4,72	4,92	5,06	5,08	4,65	4,75	4,92	5,00
Standardabw.	0,14	0,30	0,13	0,12	0,12	0,07	0,15	0,17	0,03	0,04	0,33	0,12

Osteocalcin - Konzentrationen (ng/ml) in den Kulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	5,18	4,40	4,98	5,51	5,49	5,53	5,57	5,13	4,83	4,73	4,91	4,92
2. Kultur	6,94	6,17	4,99	5,32	5,23	5,34	5,59	5,07	5,22	5,00	5,41	4,91
Mittelwert	6,06	5,28	4,98	5,415	5,36	5,43	5,58	5,10	5,02	4,86	5,16	4,91
Standardabw.	1,24	1,25	0,00	0,13	0,18	0,13	0,01	0,04	0,27	0,19	0,35	0,00

Osteocalcin - Konzentrationen (ng/ml) in den Kulturen, in denen Spongostan und MG63 – Zellen ohne Überführung kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	6,06	5,59	5,51	5,24	5,43	4,97	5,04	5,02	4,98	4,69	4,81	4,84
2. Kultur	5,76	5,44	5,40	5,14	5,15	4,94	4,81	4,63	4,59	4,55	4,66	4,59
Mittelwert	5,91	5,51	5,45	5,19	5,29	4,95	4,92	4,82	4,78	4,62	4,73	4,71
Standardabw.	0,21	0,10	0,07	0,07	0,19	0,02	0,16	0,27	0,27	0,09	0,10	0,17

LDH - Konzentrationen (U/L) bei 700.000 Zellen MG63/Schwamm ohne gasdurchlässigen Folienboden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0	2	2	5	6	5	8	7	5	12	2	3
2. Kultur	0	0	1	2	0	1	8	0	0	2	0	4
3. Kultur	4	0	4	3	0	0	1	0	2	0	1	0
4. Kultur	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	0	0
5. Kultur	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
6. Kultur	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
7. Kultur	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0
8. Kultur	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
9. Kultur	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10. Kultur	0	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0	0

Mittelwert	0,4	0,3	1	1	1	0,6	2,5	0,7	0,8	1,4	0,3	0,7
Standardabw.	1,26	0,67	1,33	1,76	2,16	1,57	3,20	2,21	1,61	3,77	0,67	1,49

LDH - Konzentrationen (U/L) im Medium

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0
2. Kultur	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0
Mittelwert	0	0	0	0	0,5	0	0,5	2	1	0	0	0
Standardabw.	0	0	0	0	0,70	0	0,70	2,82	1,41	0	0	0

LDH - Konzentrationen (U/L) im Medium inklusive eines Spongostan – Schwamms

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2. Kultur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Mittelwert	0	1	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0,5	0
Standardabw.	0	1,41	0	0	0	0,70	0	0	0	0	0,70	0

LDH - Konzentrationen (U/L) in den Kulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2. Kultur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5
Standardabw.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,70

LDH - Konzentrationen (U/L) in den Kulturen, in denen Spongostan und MG63 – Zellen ohne Überführung kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2. Kultur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Standardabw.	0	1,41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

LDH - Konzentrationen (U/L) bei 700.000 Zellen MG63/Schwamm mit der Lumox dish gasdurchlässigen Kulturschale

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	4	12	15	30	20	4	10	26	28	15	9	15
2. Kultur	3	1	12	8	6	4	7	17	16	16	12	7
3. Kultur	5	7	10	22	12	9	5	9	19	17	8	10
4. Kultur	0	1	4	7	7	4	5	8	9	5	8	3
5. Kultur	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	3	3
6. Kultur	0	0	4	2	0	2	2	1	2	1	0	2
7. Kultur	1	0	3	2	0	0	0	0	4	0	0	0
8. Kultur	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9. Kultur	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0	1
10. Kultur	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0

Mittelwert	1,3	2,4	4,8	7,1	4,5	2,5	3,3	6,2	8,1	5,7	4	4,1
Standardabw.	1,94	4,03	5,57	10,54	6,88	2,87	3,40	8,99	9,74	7,30	4,73	5,04

LDH - Konzentrationen (U/L) im Medium

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
2. Kultur	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Mittelwert	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	1,5
Standardabw.	0	0	0	0	0	0	0	0,70	0	0	0	2,12

LDH - Konzentrationen (U/L) in den Kontrollkulturen inklusive eines Spongostan – Schwamms

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
2. Kultur	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0
Mittelwert	0	2	0	0	0,5	0	0	0	0	0,5	6	0
Standardabw.	0	2,82	0	0	0,70	0	0	0	0	0,70	8,48	0

LDH - Konzentrationen (U/L) in den Kulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	43	0	3	0	0	0	1	0	1	0	0	0
2. Kultur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert	21,5	0	1,5	0	0	0	0,5	0	0,5	0	0	0
Standardabw.	30,40	0	2,12	0	0	0	0,70	0	0,70	0	0	0

LDH - Konzentrationen (U/L) in den Kulturen, in denen Spongostan und MG63 – Zellen ohne Überführung kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2. Kultur	2	0	0	0	0	0	0	4	2	1	0	0
Mittelwert	1	0	0	0	0	0,5	0	2	1	0,5	0	0
Standardabw.	1,41	0	0	0	0	0,70	0	2,82	1,41	0,70	0	0

Calcium - Konzentrationen (g/l) bei 700.000 Zellen MG63/Schwamm ohne gasdurchlässigen Folienboden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0,55	0,59	0,63	0,56	0,64	0,63	0,60	0,62	0,63	0,61	0,61	0,65
2. Kultur	0,55	0,57	0,59	0,58	0,60	0,60	0,58	0,59	0,55	0,58	0,58	0,56
3. Kultur	0,56	0,58	0,57	0,58	0,56	0,56	0,58	0,58	0,60	0,61	0,60	0,58
4. Kultur	0,59	0,61	0,67	0,62	0,62	0,65	0,58	0,62	0,63	0,62	0,63	0,64
5. Kultur	0,63	0,63	0,64	0,64	0,64	0,64	0,63	0,66	0,68	0,66	0,67	0,65
6. Kultur	0,59	0,62	0,62	0,60	0,62	0,63	0,61	0,62	0,63	0,64	0,63	0,63
7. Kultur	0,60	0,61	0,60	0,60	0,61	0,60	0,60	0,62	0,62	0,61	0,61	0,62
8. Kultur	0,61	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,59	0,63	0,63	0,63	0,63	0,62
9. Kultur	0,65	0,63	0,64	0,63	0,63	0,64	0,61	0,65	0,66	0,64	0,64	0,65
10. Kultur	0,60	0,62	0,62	0,61	0,62	0,62	0,60	0,63	0,62	0,63	0,62	0,62

Mittelwert	0,593	0,609	0,621	0,605	0,617	0,62	0,598	0,622	0,625	0,623	0,622	0,622
Standardabw.	0,033	0,021	0,028	0,025	0,023	0,026	0,016	0,023	0,034	0,022	0,024	0,030

Calcium - Konzentrationen (g/l) im Medium

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0,55	0,61	0,59	0,60	0,60	0,59	0,52	0,61	0,60	0,61	0,60	0,59
2. Kultur	0,60	0,60	0,60	0,59	0,61	0,61	0,59	0,60	0,62	0,61	0,58	0,59
Mittelwert	0,575	0,605	0,595	0,595	0,605	0,6	0,555	0,605	0,61	0,61	0,59	0,59
Standardabw.	0,035	0,007	0,007	0,007	0,007	0,014	0,049	0,007	0,014	0	0,014	0

Calcium - Konzentrationen (g/l) im Medium inklusive eines Spongostan – Schwamms

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0,61	0,61	0,63	0,60	0,59	0,59	0,61	0,63	0,60	0,62	0,62	0,61
2. Kultur	0,63	0,63	0,65	0,64	0,64	0,66	0,60	0,64	0,65	0,63	0,63	0,62
Mittelwert	0,62	0,62	0,64	0,62	0,615	0,625	0,605	0,635	0,625	0,625	0,625	0,615
Standardabw.	0,014	0,014	0,014	0,028	0,035	0,049	0,007	0,007	0,035	0,007	0,007	0,007

Calcium - Konzentrationen (g/l) in den Kulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0,62	0,61	0,61	0,60	0,61	0,62	0,59	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62
2. Kultur	0,62	0,62	0,62	0,62	0,63	0,62	0,56	0,62	0,63	0,62	0,64	0,63
Mittelwert	0,62	0,615	0,615	0,61	0,62	0,62	0,575	0,62	0,625	0,62	0,63	0,625
Standardabw.	0	0,007	0,007	0,014	0,014	0	0,021	0	0,007	0	0,014	0,007

Calcium - Konzentrationen (g/l) in den Kulturen, in denen Spongostan und MG63 – Zellen ohne Überführung kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0,62	0,62	0,62	0,60	0,60	0,62	0,58	0,62	0,62	0,62	0,61	0,62
2. Kultur	0,63	0,63	0,63	0,63	0,62	0,63	0,58	0,62	0,62	0,62	0,61	0,62
Mittelwert	0,625	0,625	0,625	0,615	0,61	0,625	0,58	0,62	0,62	0,62	0,61	0,62
Standardabw.	0,007	0,007	0,007	0,021	0,014	0,007	0	0	0	0	0	0

Calcium - Konzentrationen (g/l) bei 700.000 Zellen MG63/Schwamm mit der Lumox dish gasdurchlässigen Kulturschale

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0,57	0,59	0,58	0,59	0,58	0,56	0,58	0,59	0,59	0,58	0,58	0,58
2. Kultur	0,60	0,60	0,61	0,60	0,60	0,60	0,61	0,60	0,61	0,61	0,62	0,61
3. Kultur	0,59	0,60	0,61	0,60	0,60	0,61	0,61	0,62	0,63	0,64	0,65	0,60
4. Kultur	0,60	0,60	0,59	0,60	0,59	0,61	0,61	0,61	0,60	0,60	0,62	0,63
5. Kultur	0,55	0,56	0,55	0,55	0,56	0,56	0,57	0,57	0,56	0,56	0,56	0,56
6. Kultur	0,56	0,56	0,56	0,56	0,55	0,56	0,58	0,58	0,57	0,57	0,56	0,55
7. Kultur	0,55	0,57	0,56	0,57	0,58	0,56	0,56	0,59	0,57	0,59	0,57	0,54
8. Kultur	0,59	0,58	0,60	0,59	0,61	0,60	0,57	0,56	0,60	0,61	0,62	0,62
9. Kultur	0,57	0,58	0,58	0,58	0,58	0,56	0,59	0,58	0,59	0,59	0,59	0,57
10. Kultur	0,59	0,59	0,60	0,58	0,59	0,60	0,61	0,60	0,60	0,60	0,61	0,61

Mittelwert	0,57	0,583	0,584	0,582	0,584	0,582	0,589	0,59	0,592	0,595	0,598	0,587
Standardabw.	0,019	0,015	0,021	0,017	0,018	0,023	0,019	0,018	0,020	0,022	0,030	0,031

Calcium - Konzentrationen (g/l) im Medium

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0,58	0,59	0,62	0,61	0,63	0,61	0,50	0,62	0,61	0,65	0,63	0,62
2. Kultur	0,61	0,61	0,59	0,60	0,62	0,61	0,62	0,62	0,61	0,61	0,63	0,58
Mittelwert	0,595	0,6	0,605	0,605	0,625	0,61	0,56	0,62	0,61	0,63	0,63	0,6
Standardabw.	0,021	0,014	0,021	0,007	0,007	0	0,084	0	0	0,028	0	0,028

Calcium - Konzentrationen (g/l) in den Kontrollkulturen inklusive eines Spongostan – Schwamms

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0,61	0,62	0,61	0,61	0,63	0,58	0,59	0,62	0,61	0,61	0,60	0,60
2. Kultur	0,61	0,60	0,59	0,60	0,58	0,62	0,60	0,63	0,56	0,60	0,61	0,61
Mittelwert	0,61	0,61	0,6	0,605	0,605	0,6	0,595	0,625	0,585	0,605	0,605	0,605
Standardabw.	0	0,014	0,014	0,007	0,035	0,028	0,007	0,007	0,035	0,007	0,007	0,007

Calcium - Konzentrationen (g/l) in den Kulturen, in denen nur MG63 – Zellen kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0,62	0,60	0,62	0,61	0,61	0,62	0,58	0,61	0,62	0,61	0,61	0,62
2. Kultur	0,60	0,61	0,63	0,62	0,62	0,62	0,63	0,63	0,63	0,64	0,64	0,63
Mittelwert	0,61	0,605	0,625	0,615	0,615	0,62	0,605	0,62	0,625	0,625	0,625	0,625
Standardabw.	0,014	0,007	0,007	0,007	0,007	0	0,035	0,014	0,007	0,021	0,021	0,007

Calcium - Konzentrationen (g/l) in den Kulturen, in denen Spongostan und MG63 – Zellen ohne Überführung kultiviert wurden

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Kultur	0,62	0,62	0,62	0,62	0,61	0,61	0,58	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61
2. Kultur	0,64	0,63	0,63	0,62	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63
Mittelwert	0,63	0,625	0,625	0,62	0,62	0,62	0,605	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62
Standardabw.	0,014	0,007	0,007	0	0,014	0,014	0,035	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014

Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen und Herren in Marburg:

Aumüller	Lang
Barth	Lill
Basler	Maier
Baum	Maisch
Cetin	Moll
Christiansen	Moosdorf
Czubayko	Mutters
Daut	Neubauer
Eilers	Oertel
Feuser	Remschmidt
Fuchs	Renz
Geus	Richter
Gozten	Rothmund
Griss	Schäfer
Grzeschik	Schmidt
Gudermann	Schnabel
Hofmann	Seitz
Jungclas	Steiniger
Klenk	Studer
Klose	Vogelmeier
Koolmann	Voigt
Krause	Wagner
Krieg	Werner
Kroll	Wulf

Danksagung

Bedanken möchte ich mich zuerst bei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Raphael Stiletto, für die Überlassung des Themas, für die hervorragende fachliche Betreuung und die außerordentlich fundierte Einführung in wissenschaftliches Denken und Arbeiten. Seine ständige Hilfsbereitschaft sowie seine angenehme und motivierende Offenheit für Diskussionen haben maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Besonderer Dank gebührt Frau Marita Kratz, Leiterin des Labors für experimentelle Orthopädie. Ohne ihr Wissen, die ständige Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung besonders in schwierigen Phasen wäre es wohl nicht möglich gewesen, die Arbeit fertig zu stellen. Ihre konstruktiven Denkanstöße, aber vor allem die freundschaftliche und herzliche Zusammenarbeit, werden mir immer in Erinnerung bleiben.

Weiterer Dank gilt den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Zentrallabors der Philipps – Universität Marburg für die Analysen der Parameter dieser Arbeit sowie den Mitarbeiterinnen des Instituts für Pathologie der Philipps – Universität Marburg für die Anfertigung der Paraffineinbettungen.

Abschließender Dank gebührt meinen Eltern, die mich während meines gesamten Studiums in allen Bereichen unterstützt haben. Ihre Geduld und ihr Rat waren mir gerade in schwierigen Zeiten stets eine große Hilfe.